



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR.

“Caracterización *in silico* de profagos de aislados de *Acinetobacter baumannii* provenientes de hospitales de la Ciudad de México”

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**LICENCIADA EN CIENCIAS CON AREA TERMINAL EN BIOQUÍMICA Y
BIOLOGÍA MOLECULAR.**

PRESENTA

KAREN NOHEMI TENORIO CARNALLA.

DIRECTOR DE TESIS
DR. SANTIAGO CASTILLO RAMÍREZ

CUERNAVACA MORELOS MAYO DEL 2022

AGRADECIMIENTOS

Por su guía, paciencia, consejos y enseñanzas para la realización del presente estudio de investigación.

Comité de tesis:

Director: Dr. Santiago Castillo Ramírez.

Asesor: Dr. Ismael L. Hernández González.

Jurado de tesis:

Presidente: Dr. Ramón González García-Conde.

Secretario: Dr. Armando Hernández Mendoza.

Vocal: Dr. Santiago Castillo Ramírez.

Suplente: Dr. Ismael Hernández.

Suplente: Dra. Sonia Dávila Ramos.

Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM).

Laboratorio de Genómica Evolutiva del Centro de Ciencias Genómicas (CCG).

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo otorgado, una beca de licenciatura, para la realización de este trabajo (CONACyT).

DEDICATORIA:

Este trabajo está dedicado a mis padres Ma. Noemi Carnalla Barajas y Jesús Tenorio Cervantes por su apoyo incondicional durante cada etapa de mi educación, por su guía, paciencia y aliento cada que sentía un bache en el camino. A mis abuelos Marcelino Carnalla Barrera y Sara Barajas Sánchez por estar conmigo en cada paso de mi vida y apoyarme a seguir adelante y alentarme a no rendirme.

A mi hermano Miguel Ángel Tenorio Carnalla por enseñarme y apoyarme cada que lo necesitaba, por ser mi ejemplo para seguir e inspirarme a lograr más de lo que pensaba. Agradezco a mi novio Israel Domínguez Valle por todo su apoyo durante toda mi carrera de licenciatura, su paciencia y aliento durante cada examen y esté trabajo.

Finalmente, agradezco al Dr. Ismael Hernández por su guía, enseñanzas y paciencia brindadas durante todo este proyecto de investigación. Así como al Dr. Santiago Castillo por su apoyo y confianza brindados para realizar este proyecto.

RESUMEN

La propagación de bacterias multirresistentes se ha convertido en un problema de salud pública en los últimos años. En ese sentido, en el 2017 la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó una lista de patógenos prioritarios para la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos, dentro de la que se ubicó a *Acinetobacter baumannii* en máxima prioridad[1]. Por otro lado, el informe anual de la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE) 2015, reportó que el 16.4% de las infecciones asociadas a la atención en salud correspondía a *A. baumannii*, lo que convirtió a esta bacteria en un importante blanco de estudio y atención en nuestro país[2]. Los estudios sobre la propagación de *Acinetobacter baumannii* en México son escasos y ha sido poco abordado desde un punto de vista genómico. En este estudio se analizó la presencia de profagos, y la posible presencia de genes de resistencia a antibióticos (ARGs, por sus siglas en inglés) dentro de los fagos, en aislados de *A. baumannii* pertenecientes a 3 hospitales de la ciudad de México. Llevé a cabo el análisis de 22 aislados de *A. baumannii* desde un punto genómico comparativo y evolutivo. La filogenia de máxima verisimilitud sugirió la introducción de algunas cepas de *A. baumannii* del Instituto Nacional de Rehabilitación (INR) al Instituto Nacional de Cancerología (INCan). Posteriormente, se llevó a cabo la búsqueda de ARGs en la que se encontraron 587 ARGs dentro de los 22 genomas. En los resultados la mayor parte de los aislados estudiados se pueden considerar como multidrogo resistentes, ya que la mayoría contenía ARGs de 3 a 5 clases diferentes de antibióticos. Se hicieron análisis para la búsqueda de profagos en los genomas, en donde se obtuvieron 177 señales de profagos predichas por Phaster y 311 por Virsorter. Para conservar solo las señales de mejor calidad, se filtraron y compararon las señales predichas por los dos programas y se descartaron las consideradas como incompletas. Con el fin de analizar la diversidad de las señales de profagos a nivel de nucleótidos y aminoácidos se analizaron sus similitudes intergenómicas con VIRIDIC. Se hizo una clasificación con VICTOR y un análisis de identidad promedio de aminoácidos con CompareM, en donde, se observó una gran diversidad entre las señales de profago pertenecientes al mismo

hospital, así como el agrupamiento y similitud de señales de profago de los 3 hospitales. Para hacer una clasificación taxonómica se utilizaron los perfiles de la base de datos de virus ortólogos (VOGs) con ayuda de Hmmer, las señales de profago se clasificaron en el orden *Caudovirales* y se dividen en 3 principales familias *Myoviridae*, *Podoviridae* y *Siphoviridae*, siendo la familia *Siphoviridae* la más representativa. Finalmente se asociaron las señales de profago con las señales de ARGs, encontrando 7 señales de profagos en distintos aislados asociados al gen de resistencia *rsmA*. Dichas señales de profagos no mostraron una gran diversidad entre ellas lo que nos indica que podrían tratarse de profagos altamente relacionados. Su clasificación taxonómica los ubicó dentro del orden *Caudovirales* y dentro de las familias: *Myoviridae*, *Podoviridae* y *Siphoviridae*. En las cepas de los 3 hospitales se halló una gran población de profagos, sin embargo, solo se encontraron genes de resistencia a antibióticos asociados a las señales de profago en aislados del INCan y el Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG). Estos datos nos sugieren la introducción del gen *rsmA* a través de transducción de genes en cepas de diferentes hospitales de la ciudad de México.

Índice.

INTRODUCCIÓN.....	12
ANTECEDENTES.....	18
JUSTIFICACIÓN.....	20
OBJETIVOS	20
OBJETIVO GENERAL.	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	21
METODOLOGÍA.....	22
CONSTRUCCIÓN DE LA BASE DE DATOS DE <i>A. baumannii</i>	22
REANOTACIÓN DE GENOMAS.....	22
RECONSTRUCCIÓN FILOGENÓMICA POR MÁXIMA VEROSIMILITUD.	22
BÚSQUEDA DE PROFAGOS	23
BÚSQUEDA DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS (ARG)	24
ASOCIACIÓN DE ARG CON SEÑALES DE PROFAGOS.	24
CARACTERIZACIÓN DE LA DIVERSIDAD DE PROFAGOS.	25
CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LOS PROFAGOS.	26
RESULTADOS Y DISCUSION	27
CONSTRUCCION DE LA BASE DE DATOS.	27
REANOTACIÓN DE LOS GENOMAS.....	28
RECONSTRUCCION FILOGENÓMICA DE LAS 22 CEPAS DE <i>A. baumannii</i> BAJO ESTUDIO.	29
PREDICCIÓN DE PROFAGOS.....	30
PREDICCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN LOS GENOMAS DE <i>A. baumannii</i>	34
DIVERSIDAD DE PROFAGOS.....	36
CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LAS SEÑALES DE FAGOS.	44
ASOCIACIÓN DE SEÑALES DE FAGOS CON LOS GENES DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA.	50
DIVERSIDAD Y CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA DE PROFAGOS ASOCIADOS A ARGs.	51
CONCLUSIONES.....	57
BIBLIOGRAFIA.....	58

Índice de Figuras.

Figura 1. Línea del tiempo del surgimiento de antimicrobianos con sus respectivos ejemplos más destacados de cada familia y fechas de las primeras apariciones de genes de resistencias a los antimicrobianos en <i>A. baumannii</i>	15
Figura 2. Gráfico de reanotación de genomas en donde se muestra la cantidad de genes (rosa), proteínas (gris) y tRNAs(verde) predichos por el programa PROKKA.	28
Figura 3. Filogenia ML que muestra las relaciones evolutivas entre los aislados en estudio. El círculo externo muestra el hospital al que pertenecen. Los puntos de colores junto a las cepas indican la secuencia tipo a la que pertenecen. .	29
Figura 4. Gráfico de predicción de señales de profagos encontrados por Phaster. Se muestra la cantidad de profagos encontrados por genoma divididos entre la calidad de secuencia asignada por Phaster. Las señales de mejor calidad se clasifican como intactas(verde), las de calidad media se mencionan como cuestionables (color rosa) y las señales con mbaja calidad son las incompletas(gris).	31
Figura 5. Gráfico de predicción de señales de profagos encontrados por VirSorter. Se muestra la cantidad de profagos encontrados por genoma divididos entre la calidad de secuencia asignada por VirSorter. Las señales de mejor calidad se clasifican como intactas(verde), las de calidad media se mencionan como cuestionables(color rosa) y las señales con baja calidad son las incompletas(gris).	32
Figura 6. Señales de ARGs halladas con ayuda de la base de datos CARD.....	35
Figura 7. Frecuencia de cada ARG encontrado en los genomas	36
Figura 8. Número total de aciertos obtenidos para cada señal de profago predicha por el programa Phaster del INCAN (valor E de $\leq 1.0e-15$ y una cobertura de $\geq 80\%$) contra la base de datos VOG. La grafica muestra un código de colores que indican la cantidad de coincidencias significativas de VOGs	

pertenecientes a Caudovirales Myoviridae(verde), Podoviridae(rosa) y Siphoviridae(gris). 45

Figura 9. Número total de aciertos obtenidos para cada señal de profago cuestionables(cat5) predicha por VirSorter del INCAN(valor E de $\leq 1.0e-15$ y una cobertura de $\geq 80\%$) contra la base de datos VOG. La grafica muestra un código de colores que indican la cantidad de coincidencias significativas de VOGs pertenecientes a Caudovirales Myoviridae(verde), Podoviridae(rosa) y Siphoviridae(gris). 46

Figura 10. Número total de aciertos obtenidos para cada señal de profago cuestionables(cat2) predicha por VirSorter del INCAN(valor E de $\leq 1.0e-15$ y una cobertura de $\geq 80\%$) contra la base de datos VOG. La grafica muestra un código de colores que indican la cantidad de coincidencias significativas de VOGs pertenecientes a Caudovirales Myoviridae(verde), Podoviridae(rosa) y Siphoviridae(gris). 47

Figura 11. Número total de aciertos obtenidos para cada señal de profago intacta(cat4) predicha por VirSorter del INCAN (valor E de $\leq 1.0e-15$ y una cobertura de $\geq 80\%$) contra la base de datos VOG. La grafica muestra un código de colores que indican la cantidad de coincidencias significativas de VOGs pertenecientes a Caudovirales Myoviridae(verde), Podoviridae(rosa) y Siphoviridae(gris). 47

Figura 12. Número total de aciertos obtenidos para cada señal de profago encontrado en las cepas del INR(valor E de $\leq 1.0e-15$ y una cobertura de $\geq 80\%$) contra la base de datos VOG. La grafica muestra un código de colores que indican la cantidad de coincidencias significativas de VOGs pertenecientes a Caudovirales Myoviridae(verde), Podoviridae(rosa) y Siphoviridae(gris). 48

Figura 13. Número total de aciertos obtenidos para cada señal de profago encontrado en las cepas del HIMFG(valor E de $\leq 1.0e-15$ y una cobertura de $\geq 80\%$) contra la base de datos VOG. La grafica muestra un código de colores que indican la cantidad de coincidencias significativas de VOGs

<p>pertenecientes a Caudovirales Myoviridae(verde), Podoviridae(rosa) y Siphoviridae(gris).</p>	49
<p>Figura 14. Mapa de Calor de Similitud intergenómica calculada por Viridic. En la esquina superior derecha se muestra el porcentaje de similitud intergenómica. En la esquina inferior izquierda se muestran la fracción de alineamiento y la porción de alineamiento por genoma</p>	52
<p>Figura 15. El árbol filogenético producido por Victor fue editado con el programa iTOL para tener una mejor visualización de los resultados relacionando su geografía (última línea de la izquierda), secuencia tipo (círculos pegados a los nombres de los profagos) y temporalidad. Como se mencionó anteriormente, Victor clasifica en categorías taxonómicas a nivel de (S), género (G) y familia (F).....</p>	53
<p>Figura 16. Mapa de calor del Analisis de Identidad promedio de aminoacidos(AAI) de las 7 señales de profagos asociadas a genes de resistencia antimicrobianos. La escala va de 0 a 100 aumentando de blanco a azul fuerte.En la barra de la izquierda se indica el hospital al que pertenece cada señal de profago.</p>	54
<p>Figura 17. Número total de aciertos obtenidos para cada señal de profago asociada a un gen de resistencia a antibióticos (valor E de $\leq 1.0e-15$ y una cobertura de $\geq 80\%$) contra la base de datos VOG. La grafica muestra un código de colores que indican la cantidad de coincidencias significativas de VOGs pertenecientes a Caudovirales Myoviridae(verde), Podoviridae(rosa) y Siphoviridae(gris).</p>	56

Índice de Tablas.

Tabla 1. Detalles de la distribución y estado de los genomas de la biblioteca utilizada en este estudio. El 77.27% de los aislados utilizados pertenecen al ST 758 y el 13.63% pertenecen al ST 1091.....	27
Tabla 2. Clasificación por categoría de señales de fago encontradas.	32
Tabla 3. Señales de fago con sitios Att.	32
Tabla 4. Numero de señales por Categoría encontradas con Virsorter.....	33
Tabla 5. Secuencias de señales intactas de profagos encontrados por Phaster considerados como duplicados por el programa VICTOR.	40
Tabla 6. Secuencias de señales de profagos cuestionables predichas por Phaster considerados como duplicados por el programa VICTOR.	41
Tabla 7. Secuencias de señales de profagos intactas encontrados por VirSorter considerados como duplicados por el programa VICTOR.	42
Tabla 8. Secuencias de señales de profagos cuestionables encontrados por VirSorter considerados como duplicados por el programa VICTOR.	42
Tabla 9. Relación de señales de fago con ARGs encontrados	50

INTRODUCCIÓN

Acinetobacter baumannii pertenece a la extensa clase de *Gammaproteobacteria* y al género *Acinetobacter*, el cual está conformado por cocobacilos pleomórficos cortos Gram negativos, estrictamente aeróbicos, catalasa positivos, oxidasa negativos, no fermentadores y no móviles [3]. La primera descripción del género *Acinetobacter* se realizó en 1911; sin embargo, su taxonomía no fue establecida sino hasta 1987 por Bouvet y Grimont. La estrecha relación entre las especies del género *Acinetobacter* dificultan la identificación a nivel de especie a través de rasgos fenotípicos y métodos quimio-taxonómicos [4]. Gracias al trabajo de Bouvet y Grimont mediante los estudios de hibridación ADN-ADN, 12 grupos de genoespecies fueron descritos. Algunos de ellos recibieron nombres formales como: *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter johnsonii*, *Acinetobacter junii* y *Acinetobacter lwoffii* [5]. Mediante estos análisis se ha observado una estrecha relación entre los genomas de *A. calcoaceticus* y *A. baumannii*, de manera tal que a veces se les menciona como complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* (ABC). Dicho complejo reúne cuatro especies altamente similares que no pueden ser diferenciadas por pruebas fenotípicas: *A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis* y *A. calcoaceticus* [6].

A. baumannii es un patógeno oportunista humano cuyas infecciones han incrementado a partir de 1970 [7]. Las infecciones causadas por esta especie son neumonía, septicemia, meningitis, infecciones del tracto urinario y de heridas; dichas infecciones están asociadas con una alta mortalidad. Siendo las más comunes la neumonía asociada a ventilación mecánica y las infecciones del torrente sanguíneo con una ocurrencia del 5% en las salas de los hospitales generales y el 54% en las unidades de cuidados intensivos (UCI) [3]. En México, el informe anual RHOVE 2015, de la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud, reportó que el 16.4% de las infecciones asociadas a la atención en salud correspondía a *A. baumannii* [2].

Para comprender mejor la epidemiología y el modo de diseminación de *A. baumannii*, se han desarrollado varios sistemas de tipificación molecular. Por

ejemplo, el análisis de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), PCR del gen de integrasa, PCR en sitios de restricción poco frecuentes, ribotipado, análisis de polimorfismo de longitud de fragmento amplificado (AFLP) y electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE). Los acuerdos internacionales para estandarizar las metodologías y permitir una amplia comparación de datos han llevado a la implementación de la tipificación de secuencias multilocus (MLST), para la cual, se han propuesto dos esquemas conocidos para esta especie: el esquema Pasteur [8] y el esquema Oxford [9]. Dichos métodos se basan en la comparación de secuencias de ADN de 7 fragmentos internos de genes que codifican proteínas que desempeñan una función vital y están presentes en todos los aislados de una especie determinada [9].

Los linajes más estudiados de *A. baumannii* son tres clonas internacionales (los clones europeos I, II y III) muestreados principalmente en Asia, Europa y Estados Unidos. Sin embargo, en América Latina se ha documentado mayor aparición de las clonas internacionales 4, 5 y recientemente la clona internacional 7 [10]. En el 2020 Cornejo-Juárez y colaboradores reportaron un brote de cepas de *A. baumannii* Multi Drogo Resistente (MDR) de años previos. Las cepas fueron identificadas entre el 2011 y 2015 en la unidad de cuidados intensivos (UCI) del INCan de la ciudad de México. En dicho estudio se analizaron 106 aislados de *A. baumannii* MDR, en donde, 99 tenían el mismo tipo de secuencia MLST 758. De estos 99 aislados, 94 tenían el mismo perfil de plásmido, 3 tenían el mismo perfil y un plásmido extra, y 2 tenían perfiles de plásmido diferentes, pero pertenecían al MLST 758 [11]. Mientras que, en el 2016 González-Villoria *et.al.* llevaron a cabo un estudio con 192 aislados de 16 diferentes hospitales de México, en donde encontraron que 22 de los aislados pertenecían a *A. baumannii* de los cuales el 59% tenían la misma secuencia tipo ST758 [12]. El ST758 es un linaje poco estudiado que no pertenece a los clones internacionales I y II; se ha extendido a Canadá, México, Honduras y Colombia. Este linaje representa una fuente de diversidad genética de aislados MDR que no han sido debidamente estudiados. En el 2020 Graña-Miraglia *et.al.* describieron la reciente aparición de la secuencia de linaje tipo 758 (ST758), que pertenece a la clona internacional 5 reportada en hospitales de México y Honduras. Los aislados

de este linaje muestran una variación considerable en los perfiles de resistencia a los antibióticos, pero la mayoría de ellos son resistentes a los carbapenémicos [10].

A través de los años *A. baumannii* se ha vuelto de gran importancia clínica debido a su notable capacidad para adquirir genes de resistencia a diferentes clases de antibióticos como: aminoglucósidos, β -lactamasas, enzimas modificadoras, defectos de permeabilidad, alteración de los sitios blanco y bombas de flujo de múltiples fármacos [4]. Esta bacteria tiene una gran cantidad de mecanismos de supervivencia en una amplia gama de entornos entre los que se encuentran factores de virulencia. Las porinas, cápsulas, lipopolisacáridos de la pared celular, enzimas, producción de biopelículas, motilidad y sistemas de adquisición de hierro son sólo algunos de los mecanismos de virulencia que se encuentran en esta bacteria. El conjunto de genes mencionados anteriormente convierte a *A. baumannii* en uno de los patógenos nosocomiales más exitosos en los hospitales del sistema de salud, incluyendo pacientes en el entorno de la UCI [5].

El aumento notorio de cepas MDR llevo a incrementar la caracterización de los elementos genéticos responsables de la resistencia. Las enzimas del grupo de las oxacilinasas (OXA), betalactamasas de espectro extendido (BLEE), se identificaron mayormente en cepas de *A. baumannii*. En 1985 fue reportada la primera enzima de tipo OXA con potente actividad carbapenemasa. Dicha enzima se denominó ARI-1, sin embargo, más tarde fue renombrada OXA-23. Posteriormente, se identificó la enzima OXA-24 en un aislado de *A. baumannii* recuperado en España en 1997, la cual, se demostró era idéntica a OXA-40. En este mismo año la OXA-26 se identificó en Bélgica y la OXA-25 se identificó en España [13]. La familia intrínseca OXA-51 de β -lactamasas se ha encontrado en todos los aislados de esta especie y se localizan en su cromosoma. Mientras que las familias OXA adquiridas (OXA-23, OXA-40, OXA-58, OXA-143 y OXA-235) se encuentran en plásmidos y ocasionalmente también en el cromosoma. Entre estas familias adquiridas, OXA-23 parece ser la más prevalente en todo el mundo. Sin embargo, OXA-239, una variante de OXA-23, se ha descrito recientemente y sólo se ha encontrado en México [10].

Poco después, las metalobetalactamas (MBL) se identificaron en *A. baumannii*, con una actividad de hidrolización de carbapenémicos de 100 a 1000 veces más potentes que las carbapenemasas de tipo OXA; sin embargo, las MBL se identificaron con menos frecuencia. Este tipo de enzimas hidrolizan todos los antibióticos lactámicos, incluidos los carbapenémicos, pero no el aztreonam. La primera variante detectada fue IMP-2 que se reportó en el 2000 en Italia, seguida un año más tarde por IMP-4 en un estudio retrospectivo de Hong Kong. Además de la producción de enzimas carbapenemasas, la resistencia a los carbapenémicos en *A. baumannii* también se ha atribuido comúnmente a mecanismos no enzimáticos, como los cambios en las proteínas de la membrana externa (OMP), bombas de

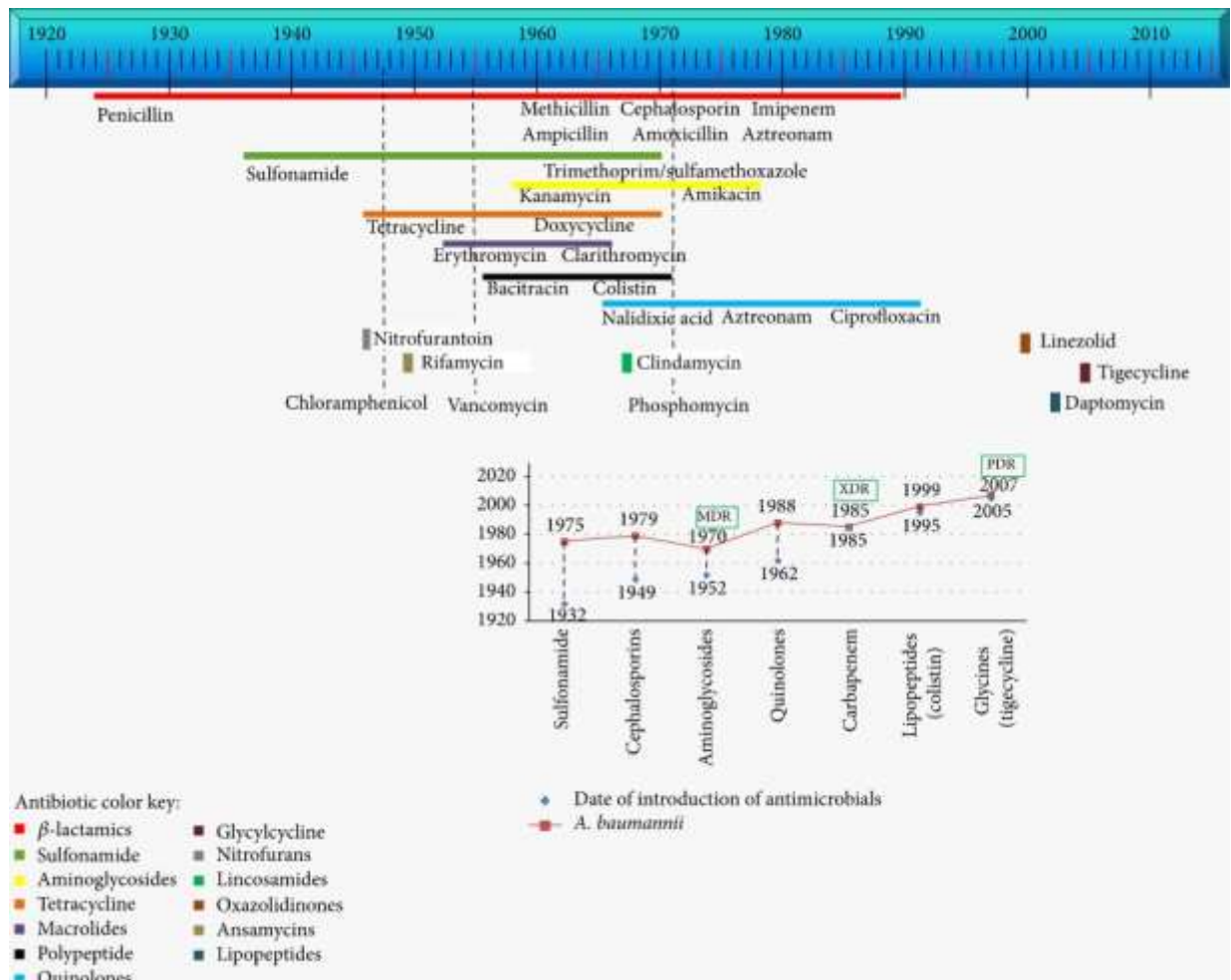


Figura 1. Línea del tiempo del surgimiento de antimicrobianos con sus respectivos ejemplos más destacados de cada familia y fechas de las primeras apariciones de genes de resistencias a los antimicrobianos en *A. baumannii*.

Tomada de: A. M. Gonzalez-Villoria y V. Valverde-Garduno, "Antibiotic-Resistant *Acinetobacter baumannii* Increasing Success Remains a Challenge as a Nosocomial Pathogen," *Journal of Pathogens*, vol. 2016, p. e7318075, feb. 2016, doi: 10.1155/2016/7318075

salida de múltiples fármacos y alteraciones en las proteínas de unión a penicilina [13]. Sin embargo, como podemos ver en la Figura 1, a través del tiempo se han descubierto genotipos resistentes a casi todo tipo de antibióticos en esta bacteria.

El genoma de *A. baumannii* se compone por un genoma central, con un tamaño relativamente pequeño, y un genoma accesorio más grande y diversificado. Esto nos indica que la pérdida y ganancia de genes es un importante factor en la evolución y adaptación de este patógeno [14]. Es de notar que se han encontrado genes de resistencia a antibiótico (ARG) tanto en su genoma central como accesorio, a menudo flanqueados por integrasas, transposasas o secuencias de inserción, lo que sugiere una posible adquisición por transferencia horizontal de genes (HGT) de otras cepas o especies bacterianas [15]. Se ha sugerido que la transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos es el principal factor que interviene en la adquisición de resistencias a múltiples fármacos (MDR) [16]. La transferencia horizontal de genes puede llevarse a cabo por diferentes mecanismos, entre los que encontramos la conjugación, transformación y transducción. La transducción de genes es mediada por virus que infectan bacterias llamados bacteriófagos, considerados como una de las entidades biológicas más abundantes en la Tierra [7]. Al infectar un huésped bacteriano, los fagos pueden llevar a cabo dos ciclos de replicación viral diferentes: 1) Ciclo lítico, en el que se replican dentro de las bacterias y provocan la lisis celular para la liberación de la progenie, 2) Ciclo lisogénico, en el cual, el genoma del fago se integra en el genoma del huésped (convirtiéndose así en un profago), en donde, se replican pasivamente junto con el genoma bacteriano [7]. Cuando las condiciones en las que se encuentra la bacteria no son favorables y su capacidad de sobrevivir o replicarse se encuentran comprometidas, el profago comienza la inducción de su genoma para pasar de un ciclo lisogénico a uno lítico. Una vez en estado lítico inicia la replicación del genoma viral para la formación de la nueva progenie y la lisis de la bacteria. Durante la inducción del profago pueden suceder algunos errores, tal como sucede cuando el genoma bacteriano se re-circulariza junto con el genoma viral formando así partículas defectivas.

Cuando los bacteriófagos optan por dirigirse hacia un ciclo lisogénico, la proliferación de la bacteria conduce al aumento del profago, replicando así su genoma de manera indirecta y simultánea. Esta relación huésped-hospedero conduce a intereses evolutivos en común, por lo que los profagos proporcionan a la bacteria rasgos beneficiosos. Un ejemplo de estos es: la protección contra la infección por otros fagos (mejor conocida como exclusión de la superinfección), el aumento de la aptitud del hospedador y la codificación de factores de virulencia (FV) como la tolerancia a los antibióticos o toxinas [7].

La dispersión de los ARG entre cepas de *A. baumannii* se ha estudiado en gran parte tomando en cuenta la conjugación. Contrario a otras bacterias como *Staphylococcus aureus*, donde el papel de los fagos ha sido bien estudiado, muy poco se sabe sobre la diversidad de fagos en *A. baumannii* [2][17]. Los estudios sobre el impacto de los fagos como agentes de transferencia horizontal en *A. baumannii*, así como los estudios sobre la dispersión de esta bacteria en hospitales de México son muy escasos. En este trabajo proponemos caracterizar la diversidad y distribución de profagos en 22 aislados de *A. baumannii* pertenecientes a tres hospitales de la Ciudad de México; incluyendo el Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG), el Instituto Nacional de Cancerología (INCan) y el Instituto Nacional de Rehabilitación (INR), así como, la identificación de genes de resistencia a antibióticos asociados a secuencias de profagos encontradas en cada una de las cepas.

ANTECEDENTES

La Transferencia Horizontal de Genes (HGT, por sus siglas en inglés) es una fuerza evolutiva de suma importancia en bacterias; la cual ha sido ampliamente estudiada en las últimas dos décadas. Entre diversos mecanismos de HGT la conjugación parece ser el proceso principal en la diseminación de ARGs. Sin embargo, también se ha informado de la competencia natural en bacterias gram negativas como es el caso de *A. baumannii*. Uno de los mecanismos de HGT menos documentados en esta especie es la transferencia de genes a través de los bacteriófagos.

Fue hasta el 2018, cuando un estudio reportó que en 74.1% de 795 genomas de *A. baumannii* analizados contenían "profagos intactos". Uno de estos profagos intactos se encontró dentro de un plásmido de *A. baumannii*. Lo cual podría indicar que los profagos integrados en estos elementos genéticos móviles pueden alcanzar una mayor diversidad de bacterias y quizás cruzar especies bacterianas. Adicionalmente, en el mismo trabajo se halló que el 78% de dichos profagos de *A. baumannii* portaban genes de virulencia y ARGs [7]. En el 2019 Wachino, JI y colaboradores demostraron que la transferencia horizontal de ARGs a nivel cromosómico estaba mediada por un mecanismo de transducción generalizado dependiente de profagos [18]. El año siguiente López-Leal *et. al.* indicaron la presencia de profagos en 133 genomas seleccionados para representar la diversidad entre las principales clonas internacionales. Los autores identificaron 1.529 profagos en los 133 genomas, con una moda de 8 profagos por genoma [17].

La importancia de *A. baumannii* como un agente patógeno nosocomial multidrogo resistente a aumentado a través de los años. Esta bacteria ha sido muy estudiada dentro del ambiente hospitalario en diversos países del mundo; sin embargo, en México existen muy pocos estudios acerca de la diversidad genómica de aislados de *A. baumannii* MDR. En diversos estudios se ha observado la importancia de la HGT para la dispersión de ARG. Además, pocos estudios han explorado la HGT por el mecanismo de transducción en *A. baumannii*. En este estudio analizamos la diversidad de profagos a una micro-escala geográfico-temporal y para ello

estudiamos los aislados clínicos de *A. baumannii* de un conjunto de hospitales localizados en la zona hospitales de la Ciudad de México.

JUSTIFICACIÓN.

Dado el escaso conocimiento de los profagos de *A. baumannii* y su papel en la transferencia de ARGs, esta tesis busca analizar la diversidad de profagos en *Acinetobacter baumannii* de aislados de tres hospitales de la Ciudad de México. Además, del posible rol de los profagos como transmisores de ARGs.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL.

Caracterizar la diversidad y distribución de profagos en las cepas de *Acinetobacter baumannii* aisladas en tres hospitales de la Ciudad de México. Así como, identificar los genes de resistencia a antibióticos asociados a estos profagos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Construir una base de datos con las secuencias genómicas de aislados de *A. baumannii* en 3 hospitales de la Ciudad de México.
2. Identificar las secuencias de profagos en los genomas de *A. baumannii*.
3. Caracterizar la diversidad de profagos.
4. Clasificar taxonómicamente los profagos.
5. Comparar la distribución de los profagos inter e intrahospitales.
6. Identificar los genes de resistencia a antibióticos asociados a profagos.

METODOLOGÍA

CONSTRUCCIÓN DE LA BASE DE DATOS DE *A. baumannii*.

Para este trabajo la base de datos de genomas de *A. baumannii* se construyó con los genomas del estudio de Graña-Miraglia *et al.* [10] tomando sólo las secuencias de *Acinetobacter baumannii* aislados en el Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG), el Instituto Nacional de Rehabilitación (INR) y el Instituto Nacional de Cancerología (INCan) de la Ciudad de México. Los genomas seleccionados se descargaron de los bioproyectos PRJNA355850 y PRJNA311558 de la base de datos GenBank del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI). En total, la base de datos comprende 22 genomas que incluyen genomas en estado completo, *scaffold*, cromosoma y *contigs*.

REANOTACIÓN DE GENOMAS

Con el objetivo de mantener la consistencia en la anotación de cada uno de los genomas en nuestra base de datos, estos fueron re-anotados utilizando el programa Prokka [19].

RECONSTRUCCIÓN FILOGENÓMICA POR MÁXIMA VEROSIMILITUD.

La reconstrucción filogenómica por Máxima Verosimilitud (ML) de las 22 cepas seleccionadas para este estudio, se llevó a cabo a nivel de nucleótidos empleando los genes que constituyen el genoma núcleo. El genoma núcleo se determinó utilizando el programa Roary [20]. Las secuencias a nivel de nucleótidos de cada una de las familias de genes que forman el genoma núcleo fueron alineadas usando el programa FSA (Fast Sequence Alignment) [21]. Cada una de las familias de genes se analizó a través del programa PhiPack[22] con el objeto de identificar y descartar aquellas familias con señales de recombinación, sólo las familias sin señales de recombinación (con un valor $\phi > 0.05$) fueron seleccionadas. Las secuencias de los genes núcleo seleccionadas, fueron concatenadas con ayuda de

un programa hecho en el laboratorio en lenguaje PERL. El modelo evolutivo se determinó con el programa ModelTest [23]. La reconstrucción por máxima verosimilitud (ML) se llevó a cabo con 100 réplicas de Bootstrap y el modelo GTR+I+G4 empleando el programa RAxML 8.2.11. La figura del árbol filogenético obtenido con RAxML 8.2.11 se editó usando la herramienta Itol (<https://itol.embl.de/>) [24].

BÚSQUEDA DE PROFAGOS

Los 22 genomas obtenidos del NCBI se sometieron a la búsqueda de profagos utilizando los programas VirSorter [25] y Phaster (<https://phaster.ca/>) [26]. Se tomaron en cuenta los resultados pertenecientes a las 3 categorías que predice Phaster, estas categorías clasifican a los fagos como intactos, cuestionables e incompletos. Para la asignación de categoría el programa Phaster le asigna a cada señal encontrada una puntuación que puede variar de un máximo de 150, el cual solo se obtiene si encuentra una coincidencia con el 100% de secuencia de un fago, a un mínimo de 10. Las señales de profago consideradas como intactas son aquellas que obtienen una puntuación entre 91 y 150, las cuestionables entre 90 y 61, mientras que las incompletas son aquellas con puntuaciones entre 60 y 10. El método por el cual saca estas puntuaciones se basa en la suma de 10 puntos siguiendo los siguientes criterios: por cada palabra clave se suman 10 puntos, si el tamaño de la región encontrada es superior a 30kb se suma 10 puntos, si encuentra al menos 40 proteínas en la región definida se suma 10 puntos y si todas las proteínas de los fagos e hipotéticas constituyen más del 70% del total de proteínas de la región encontrada se suman 10 puntos[26]. Así mismo, se tomaron en cuenta los resultados pertenecientes a las 3 categorías, en donde, la categoría 1(intactas) muestra las predicciones “más seguras”, las cuales, tienen un enriquecimiento significativo en genes similares a virus o genes no Caudovirales en toda la región y se detecta al menos un gen viral característico. Mientras que la categoría 2(cuestionables) muestra las predicciones “*probables*”, cuyas regiones tienen enriquecimiento en genes virales o no Caudovirales, o un gen distintivo viral detectado, asociado con al menos otra métrica (disminución de la afiliación PFAM,

enriquecimiento en genes no caracterizados, enriquecimiento en genes cortos, reducciones en el cambio de hebra). Finalmente, la categoría 3(incompletas) nos muestra las predicciones “posibles” los cuales no tienen un gen distintivo viral ni un enriquecimiento en genes similares a virus o no Caudovirales[25].

Las regiones comprendidas en las señales de profagos fueron anotadas con el programa PROKKA[19].

BÚSQUEDA DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS (ARG)

La búsqueda de genes de resistencia a antibióticos (ARGs por sus siglas en inglés) en cada genoma se lleva cabo utilizando la base de datos CARD y la herramienta RGI 5.1.1 [27]. Los resultados fueron evaluados tomando en cuenta los parámetros: Porcentaje de Identidad y Porcentaje del Largo de la Secuencia de Referencia, por lo que, únicamente se tomaron aquellos resultados con un porcentaje de identidad ≥ 80 y un porcentaje de largo de la secuencia de referencia ≥ 90 .

ASOCIACIÓN DE ARG CON SEÑALES DE PROFAGOS.

Con la finalidad de investigar si existe una asociación entre los ARGs encontrados y las regiones identificadas como profagos por VirSorter y Phaster, las coordenadas de cada una de las regiones de profagos fueron comparadas con las coordenadas de cada ARG identificado por genoma. Dicha comparación se realizó con ayuda de un programa escrito en PERL en el laboratorio, con el cual, se construyó una lista con las coordenadas en donde se encontraron las coincidencias y la clase de droga a la que pertenece.

CARACTERIZACIÓN DE LA DIVERSIDAD DE PROFAGOS.

Para analizar la diversidad de los profagos hallados, las señales obtenidas con los programas Phaster y VirSorter fueron comparadas entre sí, con el fin de obtener una lista de señales de profago en común. Posteriormente, se seleccionaron únicamente aquellas señales pertenecientes a las categorías 1 y 2, ya que dichas categorías son consideradas de mejor calidad por los programas.

Para clasificar las señales de profagos utilizamos la herramienta bioinformática VICTOR[28] a través de su servicio web(<https://ggdc.dsmz.de/victor.php#>). Dicho programa se encarga de la clasificación de virus procarióticos, a través de métodos que abarcan tanto técnicas de agrupación como inferencia filogenética. Las secuencias de los profagos se agruparon de acuerdo con las categorías intactas y cuestionables asignadas por Phaster y VirSorter, con el objeto de no sobrepasar los requerimientos del servicio web, ya que tiene un límite de 100 secuencias por análisis. Los árboles filogenéticos de salida están basados en las fórmulas GBDP d_0 , d_4 y d_6 , dichos árboles cuentan con etiquetas después del símbolo “@”, las cuales, describen las categorías taxonómicas en las que se clasifican en nivel de especie (S), género (G) y familia (F). Para este análisis se tomaron los árboles filogenéticos seleccionados corresponden a la fórmula de distancia GBDP d_0 (Meier-Kolthoff y Göker, 2017) recomendada por VICTOR para análisis de nucleótidos. Los árboles fueron editados con el programa en línea iTOL (<https://itol.embl.de/>)[29].

El programa VIRIDIC[30] (<http://rhea.icbm.uni-oldenburg.de/VIRIDIC/>) se utilizó para calcular las similitudes intergenómicas de los profagos. VIRIDIC alinea las secuencias de profagos utilizando BLASTn+ y utiliza la salida del alineamiento para calcular la similitud intergenómica por pares, basándose en la fracción alineada de cada genoma y la relación de longitud entre el genoma 1 y 2.

Con el fin de llevar a cabo un análisis de la diversidad de las señales de profagos a nivel de aminoácidos, las regiones de los profagos fueron anotadas con PROKKA y los ORFs comprendidos en estas regiones se emplearon para calcular la identidad promedio de aminoácidos (AAI por sus siglas en inglés) mediante el programa

CompareM v0.1.2(<https://github.com/dparks1134/CompareM>) utilizando los parámetros predeterminados del programa. Los resultados fueron organizados en una matriz para la construcción de un mapa de calor con el paquete estadístico de R ComplexHeatmap.

Para averiguar si los profagos asociados a ARGs correspondían a uno o más fagos. Fueron analizados con los programas VICTOR, VIRIDIC y CompareM como se describe anteriormente.

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LOS PROFAGOS.

La clasificación taxonómica de las señales de profago se llevó a cabo mediante la construcción de perfiles filogenéticos, utilizando la base de datos VOGs (Virus Orthologous Groups). La base de datos VOGs comprende un amplio conjunto de familias de genes ortólogos, es decir, aquellos genes compartidos en múltiples genomas completos de virus que infectan bacterias o arqueas [31]. La base de datos contiene los alineamientos de secuencias múltiples y los perfiles HMM (Hidden Markov Models) de cada VOG. La búsqueda de los perfiles HMM se llevó a cabo usando la secuencia de aminoácidos de los ORF (Open Reading Frame) comprendidos en las regiones de profago con el programa HMMER 3.3.2 [32]. Se consideraron como coincidencias significativas aquellas con un e-value $\leq 1.0e^{-15}$ con y con una cobertura de alineación $\geq 80\%$. La asignación taxonómica se realizó tomando la familia y género más representativo de cada VOGs.

El procedimiento anterior fue realizado de la misma manera para caracterizar la taxonomía de las señales de profago asociadas a ARGs.

RESULTADOS Y DISCUSION

CONSTRUCCION DE LA BASE DE DATOS.

Con el fin de llevar a cabo el estudio sobre la diversidad de profagos a una microescala (tanto geográfica como temporal), se construyó una base de datos con 22 genomas de *A. baumannii* de aislados provenientes de 3 hospitales de la Ciudad de México. Los genomas se encuentran en estado de completos, *scaffold*, cromosoma y *contigs*. Como se muestra en la tabla 1.

Los aislados provenientes del Instituto Nacional de Rehabilitación (INR) y del Instituto Nacional de Cancerología (INCan) se obtuvieron del bioproyecto PRJNA355850, los cuales, fueron aislados entre el 2011 y 2015. Mientras que el aislado proveniente del Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG) se obtuvo del bioproyecto PRJNA311558 y fue aislado en el 2015.

Cepa	Biosample	Hospital	Edo. Del genoma	Años	ST
810CP	SAMN07559626	HIMFG	Genoma Completo	2015	758
Ab11510	SAMN06093832	INCan	Cromosoma	2012	758
Ab11551	SAMN06111363	INCan	Contig	2011	758
Ab11536	SAMN06111381	INCan	Contig	2011	758
Ab11547	SAMN06111389	INCan	Contig	2013	758
Ab11606	SAMN06111391	INCan	Contig	2011	758
Ab11598	SAMN06111392	INCan	Contig	2011	758
Ab4113	SAMN06111393	INCan	Contig	2013	758
Ab11502	SAMN06111394	INCan	Contig	2012	758
Ab2159	SAMN10955939	INCan	Contig	2011	758
Ab4197	SAMN10955940	INCan	Contig	2013	758
Ab5013	SAMN10955941	INCan	Contig	2014	758
H350	SAMN10910649	INR	Contig	2015	208
H008	SAMN10910650	INR	Contig	2011	690
A158	SAMN10910651	INR	Scaffold	2012	758
A580	SAMN10910652	INR	Contig	2015	758
H251	SAMN10910653	INR	Contig	2014	758
A465	SAMN10910654	INR	Contig	2014	758
A278	SAMN10910655	INR	Contig	2013	758
A023	SAMN10910656	INR	Contig	2011	1091
A229	SAMN10910657	INR	Contig	2013	1091
H170	SAMN10910658	INR	Contig	2013	1091

Tabla 1. Detalles de la distribución y estado de los genomas de la biblioteca utilizada en este estudio. El 77.27% de los aislados utilizados pertenecen al ST 758 y el 13.63% pertenecen al ST 1091.

REANOTACIÓN DE LOS GENOMAS.

Los 22 genomas que componen nuestra base de datos fueron reanotados con el fin de tener consistencia en la anotación entre cada uno de los genomas. Los resultados de la reanotación arrojaron un promedio de 3807.27 genes, 3742.54 proteínas y 63.72 tRNAs por genoma. La figura 2, muestra los resultados obtenidos del proceso de reanotación para cada genoma.

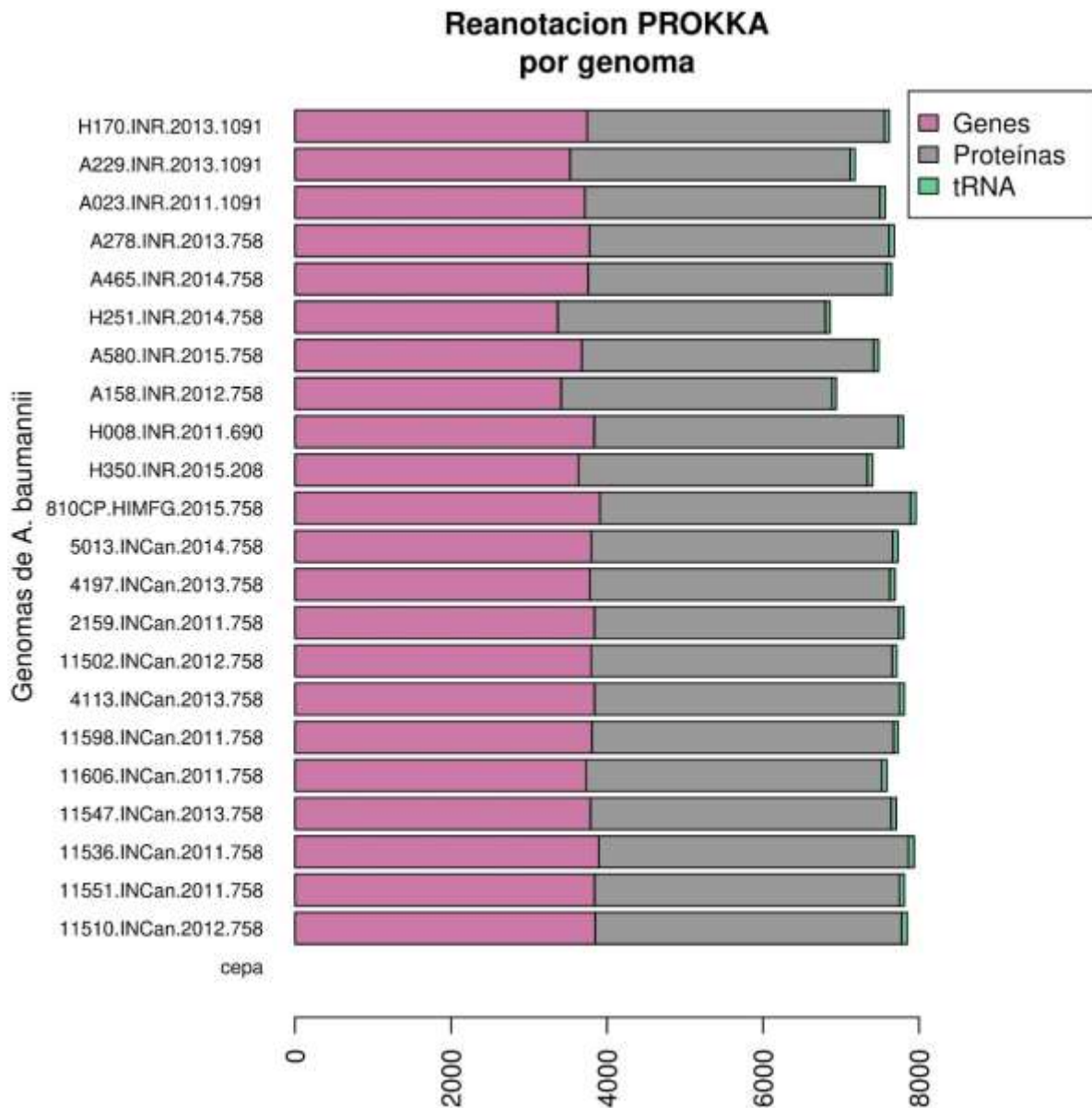


Figura 2. Gráfico de reanotación de genomas en donde se muestra la cantidad de genes (rosa), proteínas (gris) y tRNAs(verde) predichos por el programa PROKKA.

RECONSTRUCCION FILOGENÓMICA DE LAS 22 CEPAS DE *A. baumannii* BAJO ESTUDIO.

Para analizar las relaciones evolutivas entre las 22 cepas de *A. baumannii* aisladas de diferentes hospitales en la Cd. de México, llevamos a cabo la reconstrucción filogenómica basada en el genoma núcleo. Con la finalidad de estudiar las relaciones evolutivas desde un punto de vista temporal y geográfico, la información

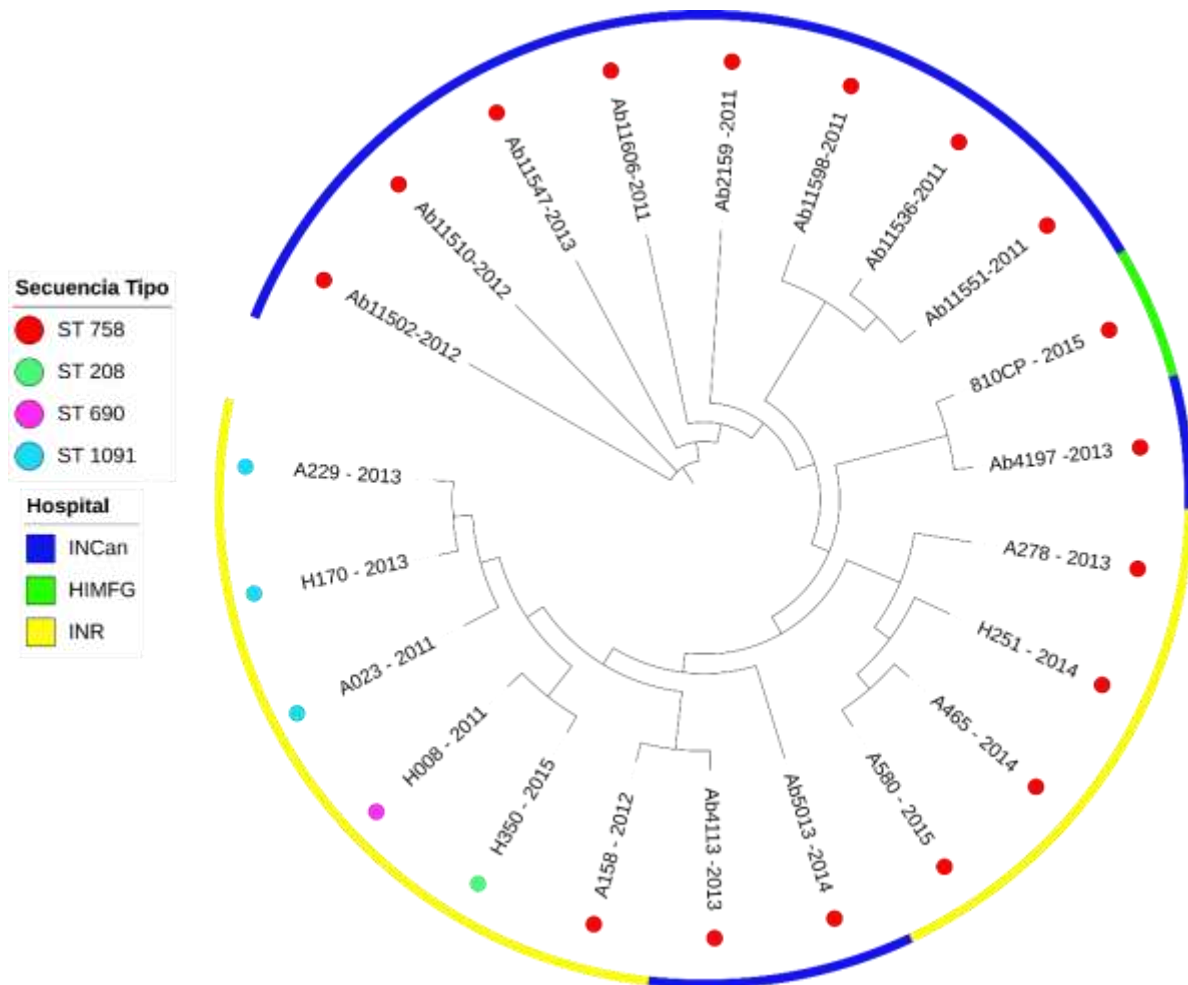


Figura 3. Filogenia ML que muestra las relaciones evolutivas entre los aislados en estudio. El círculo externo muestra el hospital al que pertenecen. Los puntos de colores junto a las cepas indican la secuencia tipo a la que pertenecen.

acerca de la secuencia tipo (ST), fecha de colecta y lugar de aislamiento son mostradas en el árbol filogenómico (Figura 3). Dentro del árbol filogenómico se observa una clara agrupación de los aislados de acuerdo con su secuencia tipo. Las cepas pertenecientes al ST1091 del INR se encuentran en un solo clado, formando

un grupo monofilético. En tanto que, las cepas H350 y H008 pertenecientes a los ST 208 y ST 690 respectivamente, forman un clado. Mientras que los aislados con el ST758 se distribuyen en distintos clados a lo largo del árbol y están presentes en los tres hospitales. No observamos una relación entre la secuencia tipo y el hospital, ya que el ST 758 se encuentra dentro de los 3 hospitales. El INR es el hospital con más variabilidad de secuencia tipo con cepas pertenecientes a los ST 1091, 208, 690 y 758. Mientras que, el INCan solo tiene cepas correspondientes al ST758, sin embargo, estas cepas están cercanamente relacionadas con las cepas del HIMFG e INR. La única cepa aislada del HIMFG se agrupa con los aislados del INCan formando un clado con el aislado Ab4197 del INCan. El hecho de que las cepas 5013 y 4113 aisladas del INCan se agrupen con las cepas del INR nos sugiere una introducción de algunas cepas de *A. baumannii* del INR al INCan. No se observa una relación entre la fecha de colecta con el ST ni las relaciones evolutivas.

PREDICCIÓN DE PROFAGOS.

La identificación de secuencias de profagos dentro de los genomas usando el programa Phaster (ver Materiales y métodos); arrojó 177 señales de profago dentro de los 22 genomas estudiados (Figura 4).

En promedio el número de señales de profago por genoma fue de 8.04, con un mínimo 5 señales de profago por genoma. De las 177 señales de fago obtenidas sólo el 27.68% de estas se clasificaron como intactas, mientras que el 67.79% se encontraron como incompletos (Materiales y métodos) (tabla 3). Por otro lado, solo el 28.81% de las señales de profago halladas cuentan con sitios Att (tabla 4).

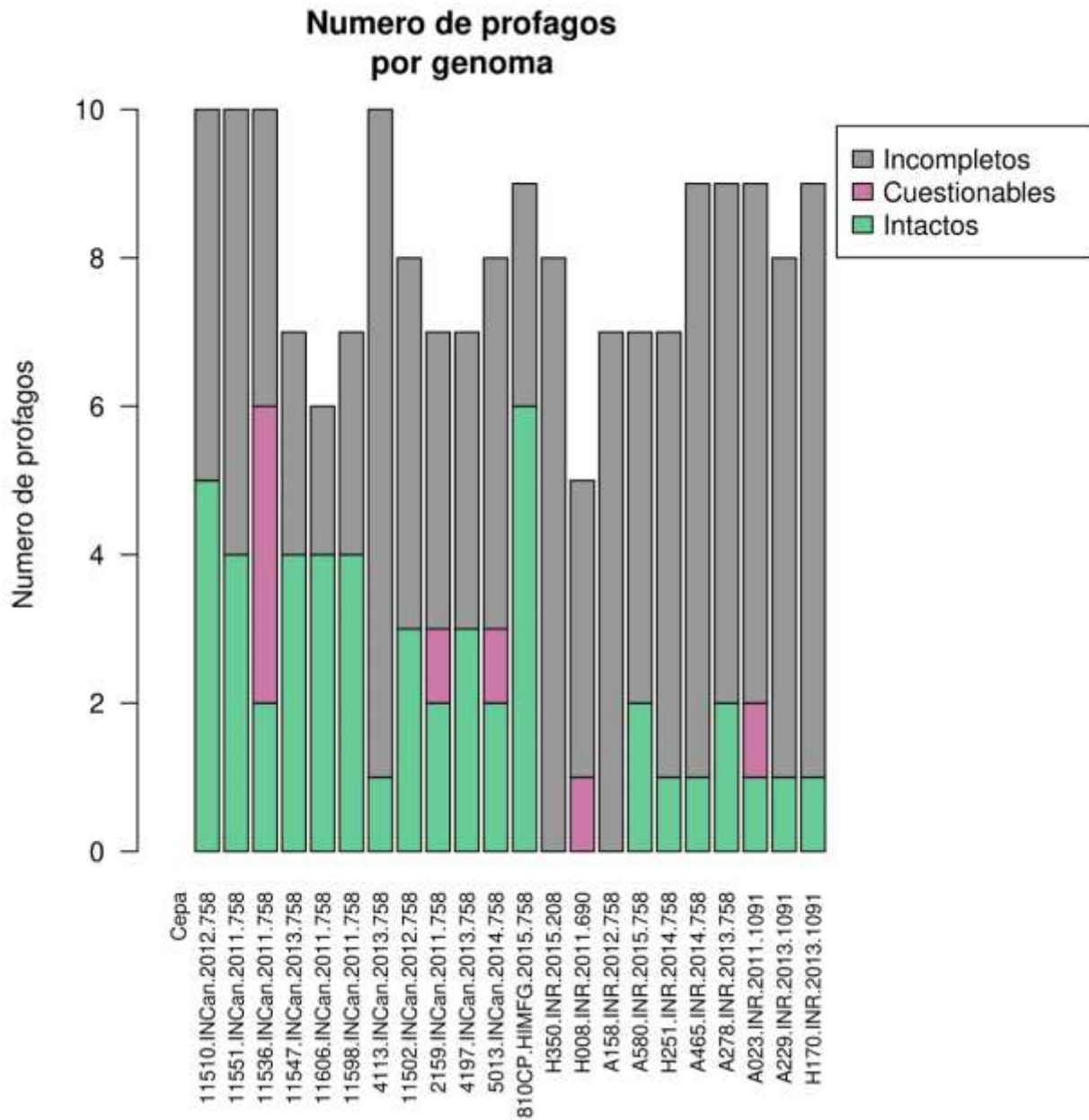


Figura 4. Gráfico de predicción de señales de profagos encontrados por Phaster. Se muestra la cantidad de profagos encontrados por genoma divididos entre la calidad de secuencia asignada por Phaster. Las señales de mejor calidad se clasifican como intactas(verde), las de calidad media se mencionan como cuestionables (color rosa) y las señales con baja calidad son las incompletas(gris).

Número de profagos por	
Intacto	49
Cuestionable	8
Incompleto	120
Total general	177

Tabla 2. Clasificación por categoría de señales de fago encontradas.

Número de profagos con sitios Att.				
	Cat1	Cat2	Cat3	Total
Sin sitios Att	37	8	81	126
Con sitios Att	12	0	39	51
Total general	49	8	120	177

Tabla 3. Señales de fago con sitios Att.

La predicción de profagos con el programa Virsorter arrojó un total de 311 señales con al menos 6 señales de profago por genomas y un promedio de 14.14 señales de profago por genoma.

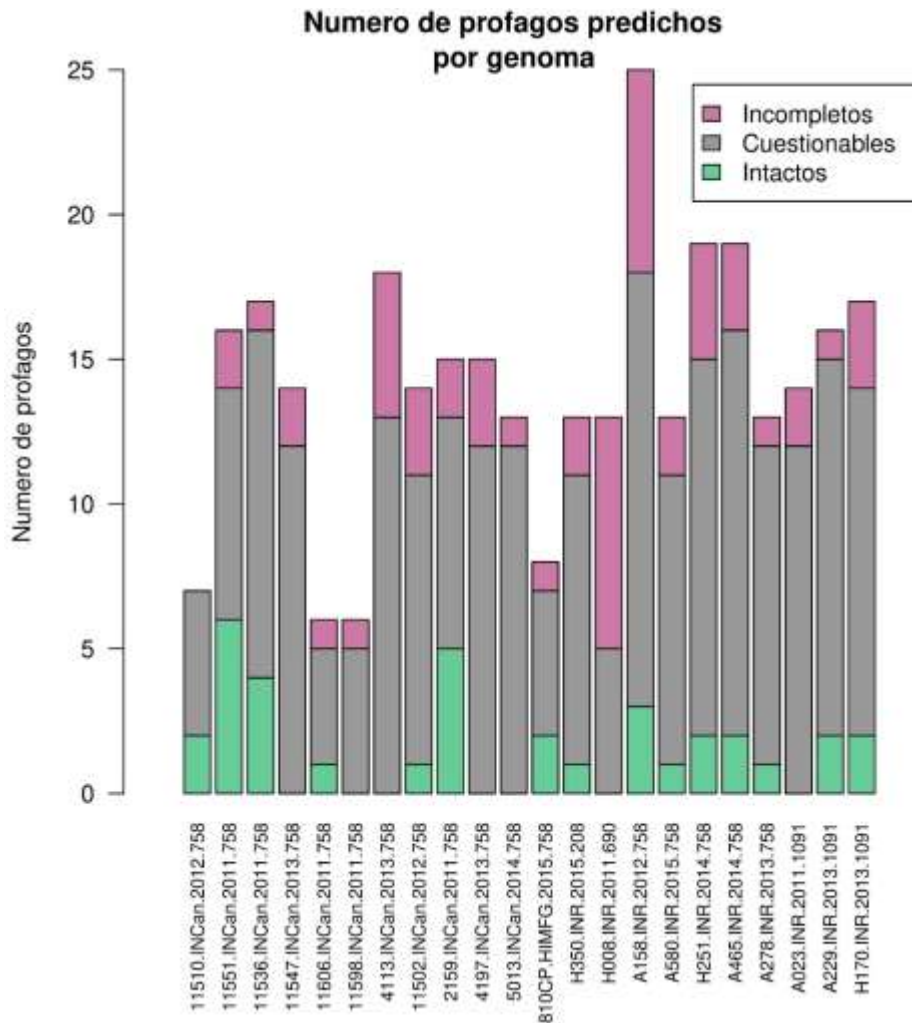


Figura 5. Gráfico de predicción de señales de profagos encontrados por VirSorter. Se muestra la cantidad de profagos encontrados por genoma divididos entre la calidad de secuencia asignada por VirSorter. Las señales de mejor calidad se clasifican como intactas(verde), las de calidad media se mencionan como cuestionables (color rosa) y las señales con baja calidad son las incompletas(gris).

De las 311 señales de profago solo el 11.25% se consideraron dentro de la categoría pertenecientes a señales intactas y el 71.06% de las señales se consideraron dentro de la categoría 2 perteneciente a las señales de profago cuestionables como se observa en la figura 5 y tabla 4. Como se observó anteriormente los aislados muestran una cantidad considerable de señales de profagos. Sin embargo, el número de señales de profagos encontradas varía, según el programa con el que se analizan las muestras. Con el programa Phaster se obtuvieron mayor cantidad de señales en los aislados provenientes del INCan, pero con el programa VirSorter se obtuvieron mayor cantidad de señales en los aislados del INR. Mientras que, en el aislado del HIMFG la cantidad de señales de profagos encontradas fue similar con ambos programas. No observamos una relación entre la cantidad de señales de profago halladas con el año de colecta ni con la ST.

Es interesante hacer notar que los resultados obtenidos con cada uno de los programas difieren entre sí en la calidad de las señales, pero no es de sorprender ya que ambos programas funcionan con criterios y propósitos diferentes. Las categorías a las cuales fueron asignadas las señales de profago resultaron ser muy variables. Ya que con el programa VirSorter la mayor parte de los resultados corresponden a señales de fago cuestionables mientras que, para Phaster la mayoría se clasifican como intactos e incompletos. Es importante señalar que podría existir una sobre estimación de señales de profagos dentro de las categorías cuestionables e incompletos ya que la mayor parte de los genomas se encuentran en estado de *contig* (*genomas no completos*).

Número de profagos por categoría.	
Categoría 1	35
Categoría 2	221
Categoría 3	55
Total general	311

Tabla 4. Numero de señales por Categoría encontradas con VirSorter

No obstante, de que la búsqueda de señales de profago fue realizada únicamente dentro de 22 aislados de *A. baumannii*, se encontró una gran cantidad de profagos dentro de dichos aislados, estos resultados son similares a los mostrados por Costa, RA. *et.al* en el 2018 y Lopéz-Leal. *et.al* en el 2020 y 2021.

PREDICCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN LOS GENOMAS DE *A. baumannii*

Dentro de la búsqueda de genes de resistencia a antibióticos observamos que la mayoría de las cepas tienen una gran cantidad y variedad de ellos. En los 22 genomas bajo estudio arrojó un total de 587 genes de resistencia antimicrobiana, con una media de 27 ARGs por genoma, con un mínimo de 21(cepa 4113) y un máximo de 35 (cepa H350) ARGs como se observa en la Figura 6.

Los genes más abundantes encontrados en las cepas estudiadas son *adeF*, *adeK*, *adel*, *abeM*, *Acinetobacter baumannii gyrA*, *abeS*, *adeG*, *Acinetobacter baumannii* *AbaF*, *adeJ*, *Acinetobacter baumannii* *AbaQ*, *LpsB* y *Acinetobacter baumannii* *AmvA* *adeH*. Dichos genes se localizan en los 22 genomas estudiados como se muestra en el Anexo 1.

Dentro del análisis se encontraron 44 diferentes familias de genes de resistencia antimicrobiana, de los cuales OXA-239 se encontró en un 91% de los genomas estudiados. La variante de OXA-239 no había sido reportada en México hasta el año 2010 por Tamayo-Legorreta *et.al* [23]. Más tarde, Graña-Miraglia y colaboradores sugirieron que OXA-239 surgió a principios del 2010 y es un gen estrechamente relacionado con la variante OXA-469, la cual, también sólo ha sido descrita en México [10]. En los genomas de las cepas A023 y Ab11510 se encontraron 2 copias de este gen OXA-239. Por otro lado, también se encontró el gen OXA-72 en el genoma A158 OXA-65 en el 91% de los genomas.

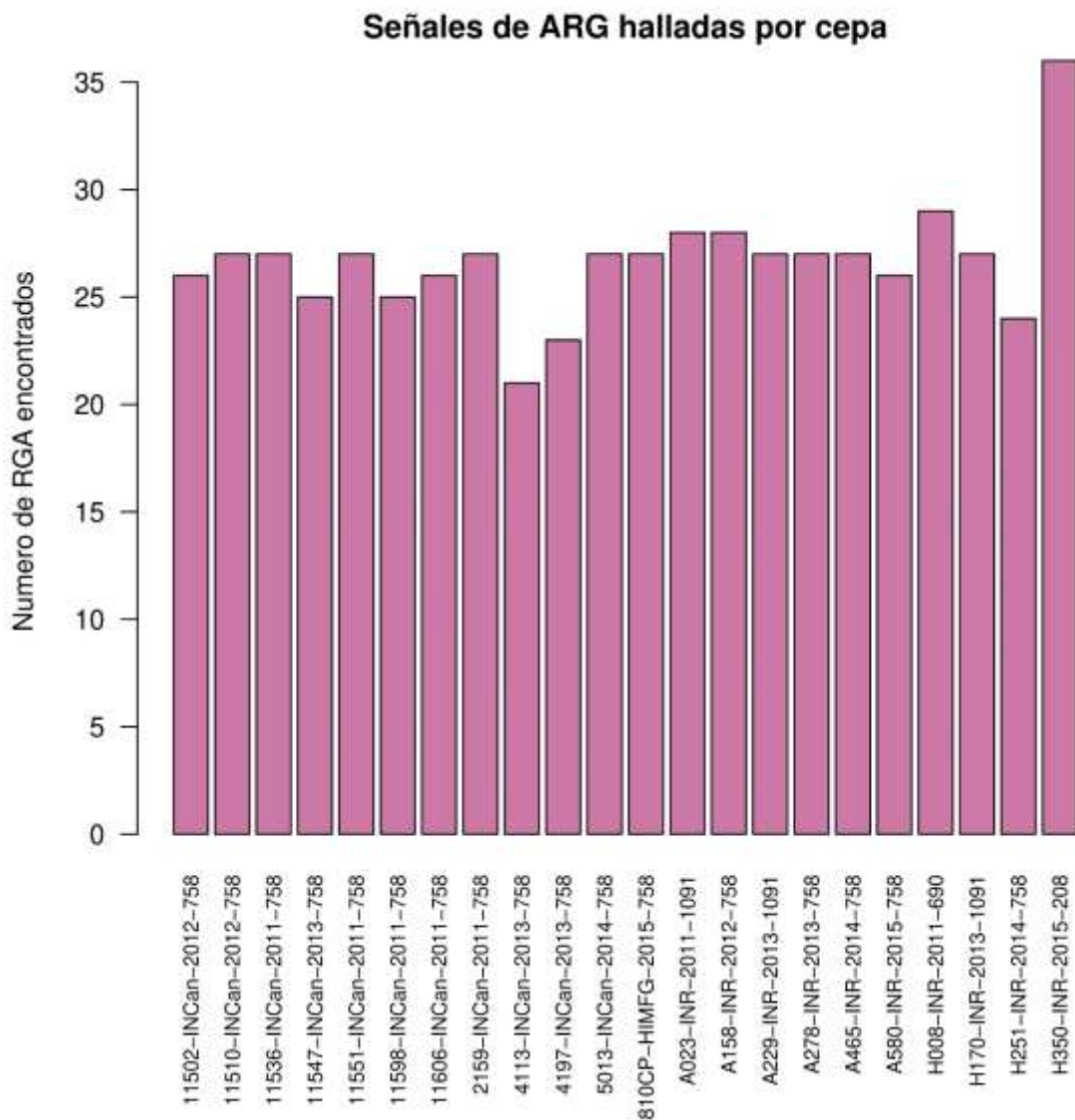


Figura 6. Señales de ARGs por genoma halladas con ayuda de la base de datos CARD.

En cada una de las cepas se encuentran entre 3-5 clases diferentes de ARGs lo que podría indicar que estas cepas son MDR, siendo la clase más abundante de ARGs las fluoroquinolonas encontradas en un 30% de los casos (Figura 7).

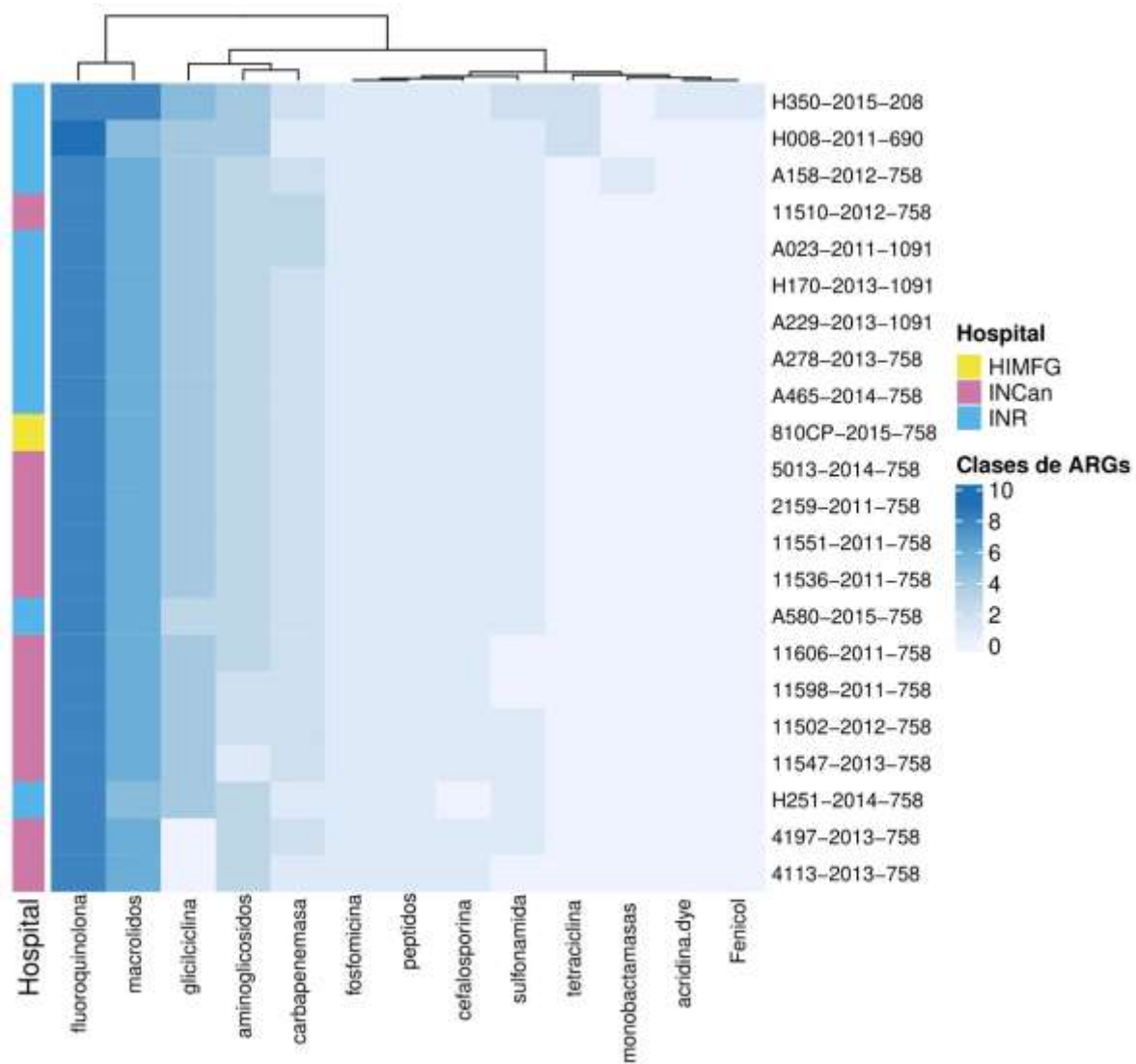


Figura 7. Frecuencia de Familias de ARG encontradas por genoma.

DIVERSIDAD DE PROFAGOS.

Para depurar las señales de profagos encontradas con los programas Phaster y VirSorter, fueron comparadas (Materiales y métodos). Las señales de profago detectadas como incompletas fueron descartadas. De esta manera, se obtuvo una lista final de 102 señales de profagos predichas por VirSorter pertenecientes a los 22 aislados de *A. baumannii* y 49 señales de profago predichas por Phaster pertenecientes únicamente a 18 aislados de *A. baumannii*.

Con la finalidad de analizar la similitud intergenómica entre las señales de profago de los distintos aislados se utilizó el programa VIRIDIC. Como se menciona en los materiales y métodos VIRIDIC calcula la similitud intergenómica a través de la alineación de secuencias; el resultado obtenido lo utiliza para calcular el largo y la fracción de alineamiento de cada genoma. Las figuras de los anexos 2 al 5 muestra los resultados en una matriz, la parte superior indica las similitudes intergenómicas entre los profagos, mientras que la parte inferior presenta la fracción de alineamiento y la porción de alineamiento por genoma.

El análisis de similitud intergenómica reveló una gran diversidad entre las señales de profago. Dentro de las señales intactas de profagos halladas con Phaster (Anexo 2) se observa la formación de 14 grupos con un porcentaje de similitud genómica del 100%. Lo que podría indicar que al menos hay 14 señales de profago distintos dentro de esta categoría. Se encontraron 2 grupos con una similitud intergenómica superior al 94.7% compuestos de señales de profago pertenecientes a los 3 hospitales, lo que nos sugiere una estrecha relación entre ellas. Mientras que las señales cuestionables de profagos predichas por Phaster (Anexo 3) se observó la formación únicamente de 6 grupos. Sin embargo, aunque la matriz está conformada por únicamente 6 señales de profagos, se observa una gran diversidad entre ellos.

Por otro lado, las señales intactas de profago predichas por VirSorter (Anexo 4), forman 11 grupos del 100% de similitud intergenómica. Dentro de los que se encuentran señales de profago del HIMFG y el INCan. Indicando una alta similitud en las secuencias de las señales de profagos de estos dos hospitales. Finalmente, dentro de las señales de profagos cuestionables predichas por VirSorter (Anexo 5), se observa la formación con más de 63 grupos con similitud intergenómica del 100%. Lo que nos indica que existe una gran diversidad entre las señales de profago, tanto dentro de los mismos Hospitales como entre ellos.

Como se mencionó anteriormente, las señales de profagos del HIMFG y del INCan suelen estar dentro de los mismos grupos. En específico las señales de profagos

encontradas en las cepas 4197, 11598, 11536 y 1151 del INCan se encuentran estrechamente relacionados genómicamente con las señales de profago de la cepa 810CP en un rango entre 100- 46% de similitud. Por otra parte, los profagos encontrados en el aislado del INCan (5013) se observan estrechamente relacionados con los profagos de las cepas del INR (A580, A465, H251) con una similitud intergenómica de alrededor del 100- 47%. Así mismo, las señales de profagos encontradas en las cepas A229, H170 y A023 del INR pertenecientes al ST 1091, muestran una similitud intergenómica de alrededor del 100-63.9%.

Los resultados de VIRIDIC (Anexo 2 al 5) muestran que la población de profagos detectados en los aislados de *A. baumannii* es muy diversa entre hospitales, así como dentro de los mismos. Sin embargo, una pequeña fracción de las señales de profago encontradas de los tres hospitales suelen agruparse, señalando una alta similitud entre ellos. Esto podría sugerir una diseminación de los aislados de *A. baumannii* entre los 3 hospitales que llevó a la diseminación del profago, o bien, que se tengan infecciones por diferentes profagos pertenecientes a la misma familia o especie.

Para analizar la diversidad de profagos desde una perspectiva diferente, se utilizó el programa VICTOR. El programa VICTOR utiliza un método de clasificación de virus procarióticos que abarca técnicas de agrupamiento basados en el alineamiento, así como, inferencias filogenéticas utilizando métodos de distancia.

La clasificación empleando el programa VICTOR de las señales de profago intactas predichas por el programa Phaster (Anexo 6) resultó en 2 diferentes Familias, 4 géneros y 14 especies. Las cuales, se agruparon en 4 clados principales compuestos por aislados de los 3 hospitales. El grupo uno está formado por señales de profago del INCan, el segundo se compone de 11 señales de profagos de aislados de los 3 hospitales, distribuidas en 3 especies (S7, S10 y S13). Mientras que, el grupo 3 está construido por 4 especies diferentes distribuidas en los 3 hospitales y el grupo 4 esta constituido con 6 especies de profagos pertenecientes a aislados del INCan y HIMFG. Las señales de profago cuestionables predichas por

el programa Phaster (Anexo 7) se clasificaron en 1 familia, 2 géneros y 6 especies diferentes, ubicadas en 2 clados. En el primer clado se agrupan señales de profago de las cepas 5013 y A023 pertenecientes al INCan e INR respectivamente, mientras que el segundo grupo está conformado únicamente por profagos encontrados en el INCan.

Las señales de profago intactas predichas por el programa VirSorter (Anexo 8) se clasificaron en 2 familias, 4 géneros y 7 especies, ubicadas en 3 principales clados. Dentro de los clados se dividen las señales de profagos del INR en el grupo 2 y las señales de profago del INCan y el HIMFG dentro del grupo 3. Finalmente, las señales de profago cuestionables predichas por el programa VirSorter (Anexo 9) se clasificaron en 2 familias, 9 géneros y 50 especies diferentes. La filogenia está formada por 6 grandes clados, dentro de los que se agrupan señales de profago de los 3 hospitales, así mismo, se observa que las señales de profago de los aislados de los diferentes ST se encuentran esparcidos alrededor de los distintos clados.

Las diferentes señales de profago de los 3 hospitales se observan dispersas dentro de las filogenias, lo que, al igual que el programa VIRIDIC nos sugiere una gran diversidad dentro de las señales de profago encontradas dentro de los mismos hospitales.

En las filogenias también se observa una alta conservación en las secuencias de las señales de profagos de los 3 hospitales. Las secuencias de profagos encontrados en la cepa del HIMFG 810CP suelen agruparse con los profagos de las cepas 4197, 11598, 11536, 1155, 11510, 11502, 11606 y 4113 del INCan, indicando que podrían tener el mismo origen. En el anexo 6 se observa que, el profago 810CP_hit5 se encuentra en el mismo nivel taxonómico, según la clasificación de Victor (S9 G1 F1) con el profago 11598_hit7. Así mismo, el profago 810CP-hit1 se asignó dentro de la clasificación S11 G2 F2 al igual que los profagos 11536-hit3 y 11598-hit4.

Del mismo modo, en el anexo 6 se observa que el fago 4113_hit4 del INCan se agrupa con el fago A158_hit4 del INR. Mientras que los fagos encontrados en la cepa del INCan 5013 (ST 758) se observaron constantemente formando grupos con

los fagos de las cepas A580 (ST 758), A023, H170 y A229 (ST 1091) del INR. Según el nivel taxonómico dentro de la clasificación de VICTOR, dichas cepas pertenecen al mismo género y familia. Únicamente el fago 5013_hit2 y el fago A023_hit4 (Anexo 9) pertenecen a un mismo nivel taxonómico (S37 G6 F1).

El programa VICTOR nos brinda una lista de secuencias las cuales considera como genomas duplicados. La lista de las señales de profago intactas de Phaster se muestra en la tabla 5 en donde se observa que señales de profago halladas en al menos 15 aislados diferentes se tomaron como genomas duplicados en el análisis.

Genomas Pha-intactos	Duplicado
11606-INCan-2011-758_hit6	11536-INCan-2011-758_hit3
11606-INCan-2011-758_hit2	810CP-HIMFG-2015-758_hit5
5013-INCan-2014-758_hit2	810CP-HIMFG-2015-758_hit5
H170-INR-2013-1091_hit3	H251-INR-2014-758_hit7
11551-INCan-2011-758_hit2	11536-INCan-2011-758_hit3
11551-INCan-2011-758_hit1	810CP-HIMFG-2015-758_hit5
4197-INCan-2013-758_hit3	5013-INCan-2014-758_hit1
A278-INR-2013-758_hit1	5013-INCan-2014-758_hit1
11547-INCan-2013-758_hit1	11502-INCan-2012-758_hit7
2159-INCan-2011-758_hit2	810CP-HIMFG-2015-758_hit5
2159-INCan-2011-758_hit1	11536-INCan-2011-758_hit3
A465-INR-2014-758_hit2	5013-INCan-2014-758_hit1
A229-INR-2013-1091_hit5	H251-INR-2014-758_hit7
11510-INCan-2012-758_hit7	11502-INCan-2012-758_hit7
11510-INCan-2012-758_hit3	810CP-HIMFG-2015-758_hit1

Tabla 5. Secuencias de señales intactas de profagos encontrados por Phaster considerados como duplicados por el programa VICTOR.

Las señales de profago cuestionables predichas por Phaster se muestran en la tabla 6 en donde 32 señales de profagos detectadas en 16 diferentes aislados de *A. baumannii* se consideraron como genomas duplicados, indicando una alta similitud entre los genomas de dichas señales.

Genomas Pha-cuestionables	Duplicado
5013-INCan-2014-758_hit6	11547-INCan-2013-758_hit3
H170-INR-2013-1091_hit9	A580-INR-2015-758_hit2
H170-INR-2013-1091_hit8	A229-INR-2013-1091_hit8
A023-INR-2011-1091_hit9	H170-INR-2013-1091_hit7
A023-INR-2011-1091_hit8	11547-INCan-2013-758_hit3
11551-INCan-2011-758_hit4	11606-INCan-2011-758_hit5
11551-INCan-2011-758_hit3	11606-INCan-2011-758_hit4
4197-INCan-2013-758_hit2	11547-INCan-2013-758_hit3
A278-INR-2013-758_hit3	11547-INCan-2013-758_hit3
11502-INCan-2012-758_hit2	11606-INCan-2011-758_hit5
11510-INCan-2012-758_hit9	11606-INCan-2011-758_hit5
2159-INCan-2011-758_hit7	11551-INCan-2011-758_hit7
2159-INCan-2011-758_hit4	11606-INCan-2011-758_hit5
2159-INCan-2011-758_hit3	11606-INCan-2011-758_hit4
A465-INR-2014-758_hit9	A580-INR-2015-758_hit2
4113-INCan-2013-758_hit1	11606-INCan-2011-758_hit5

Tabla 6. Secuencias de señales de profagos cuestionables predichas por Phaster considerados como duplicados por el programa VICTOR.

Por último, 28 las señales de profagos intactas y 6 cuestionables detectadas por el programa Virsorter en 14 cepas diferentes se consideraron como genomas duplicados (Tablas 7 y 8). Estas señales de profago consideradas como genomas duplicados se podrían interpretar como una alta similitud entre los genomas de las señales de profago de distintos aislados.

Genoma	Duplicado
11606-INCan-2011-758-hit3	11551-INCan-2011-758-hit4
11510-INCan-2012-758-hit2	11547-INCan-2013-758-hit2
11502-INCan-2012-758-hit3	11547-INCan-2013-758-hit2
5013-INCan-2014-758-hit3	11551-INCan-2011-758-hit4
4197-INCan-2013-758-hit5	11547-INCan-2013-758-hit4
4197-INCan-2013-758-hit4	11551-INCan-2011-758-hit4
4197-INCan-2013-758-hit1	5013-INCan-2014-758-hit1
2159-INCan-2011-758-hit2	11551-INCan-2011-758-hit4
A465-INR-2014-758-hit5	H170-INR-2013-1091-hit4
A278-INR-2013-758-hit4	11547-INCan-2013-758-hit4
A278-INR-2013-758-hit2	5013-INCan-2014-758-hit1
810CP-HI-2015-758-hit5	11551-INCan-2011-758-hit4
11598-INCan-2011-758-hit2	11551-INCan-2011-758-hit4
11551-INCan-2011-758-hit7	2159-INCan-2011-758-hit3

Tabla 7. Secuencias de señales de profagos intactas encontrados por VirSorter considerados como duplicados por el programa VICTOR.

Genoma VIR-CAT1	Duplicado
A229-INR-2013-1091-hit1	H170-INR-2013-1091-hit1
11551-INCan-2011-758-hit2	11606-INCan-2011-758-hit1
2159-INCan-2011-758-hit1	11551-INCan-2011-758-hit1

Tabla 8. Secuencias de señales de profagos cuestionables encontrados por VirSorter considerados como duplicados por el programa VICTOR.

Dentro de este análisis se observa que distintos profagos de los aislados del HIMFG, INCan e INR comparten grupos, así como su clasificación dentro del mismo nivel

taxonómico lo que nos indica una ancestría común reciente entre los profagos encontrados en los aislados de *A. baumannii*.

Con el fin de analizar la diversidad de las señales de profagos a nivel de aminoácidos utilizamos el programa CompareM, el cual, tiene un conjunto de herramienta que permite hacer análisis genómicos comparativos a gran escala. Se utilizó el cálculo de identidad promedio de aminoácidos promedio (AAI) con los parámetros predeterminados y se construyó un mapa de calor para una mejor visualización de los datos (Anexos 10 y 11).

Las 49 señales de profagos predichas con el programa Phaster forman 7 clusters, compuestos por señales de profagos de los 3 distintos hospitales. Se observa una gran diversidad entre las señales de profago pertenecientes al mismo hospital, así como, similitudes de hasta el 100% entre señales de profago de los distintos hospitales. No distinguimos una relación entre las señales de profago, la fecha de colecta y la ST (Anexo 10). Las 102 señales de profago predichas por el programa Virsorter forman un total de 15 grupos. Cada uno de los grupos contiene señales de profago pertenecientes a 2 o 3 hospitales. Se observa una gran diversidad entre las señales de profagos analizadas principalmente entre las señales de profago del mismo hospital. No se encontró una relación cronológica con las señales de profago que conforman los grupos, sin embargo, se observa que las señales de profago se agrupan por categorías (intactas e incompletas). La mayor parte de las señales de profago pertenecientes a la categoría Intactas (Cat4) se dividen en 3 grupos, esto puede ocurrir ya que las señales de profago clasificadas como intactas son más grandes que las cuestionables.

Los análisis a nivel de nucleótidos para observar la diversidad de las señales de profago muestran una gran diversidad entre las señales de profago pertenecientes al mismo hospital, de igual manera el análisis de AAI mostró los mismos resultados. Así mismo dentro de los tres análisis se observa la formación de grupos entre las señales de los 3 hospitales, lo que nos podría indicar que los profagos que infectan a las cepas de *A. baumannii* dentro de estos hospitales están evolutivamente

relacionados o simplemente un conjunto de profagos tienden a infectar a *A. baumannii* dentro de las zonas hospitalarias.

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LAS SEÑALES DE FAGOS.

Debido a que las señales de profagos de las cepas en estudio se encuentran fragmentadas, se optó por comparar las proteínas de las señales de profagos contra la base de datos de Grupos de Virus Ortólogos (VOG por sus siglas en inglés). La base de datos VOG contiene grupos de genes ortólogos en genomas completos de virus que infectan bacterias o arqueas. Esto nos permitió llevar a cabo una asignación taxonómica para los genomas de profagos encontrados dentro de los aislados de *A. baumannii*. Todas las señales de profagos se clasificaron dentro del orden *Caudovirales* y se dividen en 3 principales familias: *Myoviridae*, *Podoviridae* y *Siphoviridae*. La familia de VOGs más representativa es la *Siphoviridae* con 62.9% de los VOGs.

Como se observa en la figura 8, 9, 10 y 11 en total la familia más representada en las señales de profago pertenecientes al INCan es *Siphoviridae* con un 58.4% de coincidencias significativas de VOGs, seguido de la familia *Myoviridae* con 22.3% y *Podoviridae* 19.3%. En la cepa 810CP del HIMFG (Figura 13) el 61.2% de los ORFs corresponden a *Siphoviridae*, el 21.6% a *Podoviridae* y el 17.2% a *Myoviridae* (Fig. 13). Por último, las señales de profago halladas en los aislados INR (Fig. 12) el 64.1% de las coincidencias pertenecen a *Siphoviridae*, el 10.2% a *Myoviridae* y el 25.6% a *Podoviridae*.

Dentro de los 3 hospitales se obtuvo una clara prevalencia de señales de profagos pertenecientes a *Siphoviridae*. Por otro lado, en el INCan se observa un mayor porcentaje de señales significativas de la familia *Myoviridae* a diferencia del HIMFG y el INR quienes tienen un porcentaje muy bajo de señales de esta familia.

Al igual que los estudios hechos por Costa, RA. *Et.al* en el 2018 y López-Leal. *Et.al* en el 2021, encontramos que los profagos de orden *Caudovirales*, mejor conocidos como fagos con cola, son los más abundantes en las diferentes cepas de *A. baumannii*, siendo la familia *Siphoviridae* la más representada dentro de las señales de profago.

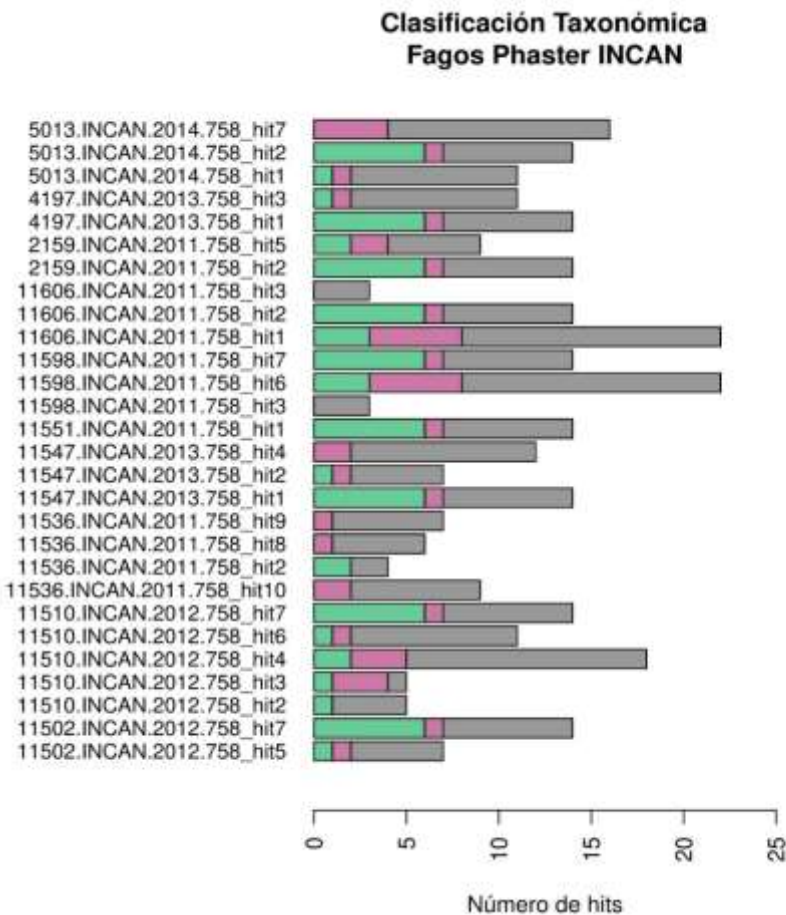


Figura 8. Número total de aciertos obtenidos para cada señal de profago predicha por el programa Phaster del INCAN (valor E de $\leq 1.0e-15$ y una cobertura de $\geq 80\%$) contra la base de datos VOG. La grafica muestra un código de colores que indican la cantidad de coincidencias significativas de VOGs pertenecientes a *Caudovirales Myoviridae*(verde), *Podoviridae*(rosa) y *Siphoviridae*(gris).

Clasificación Taxonómica Profagos INCan CAT5

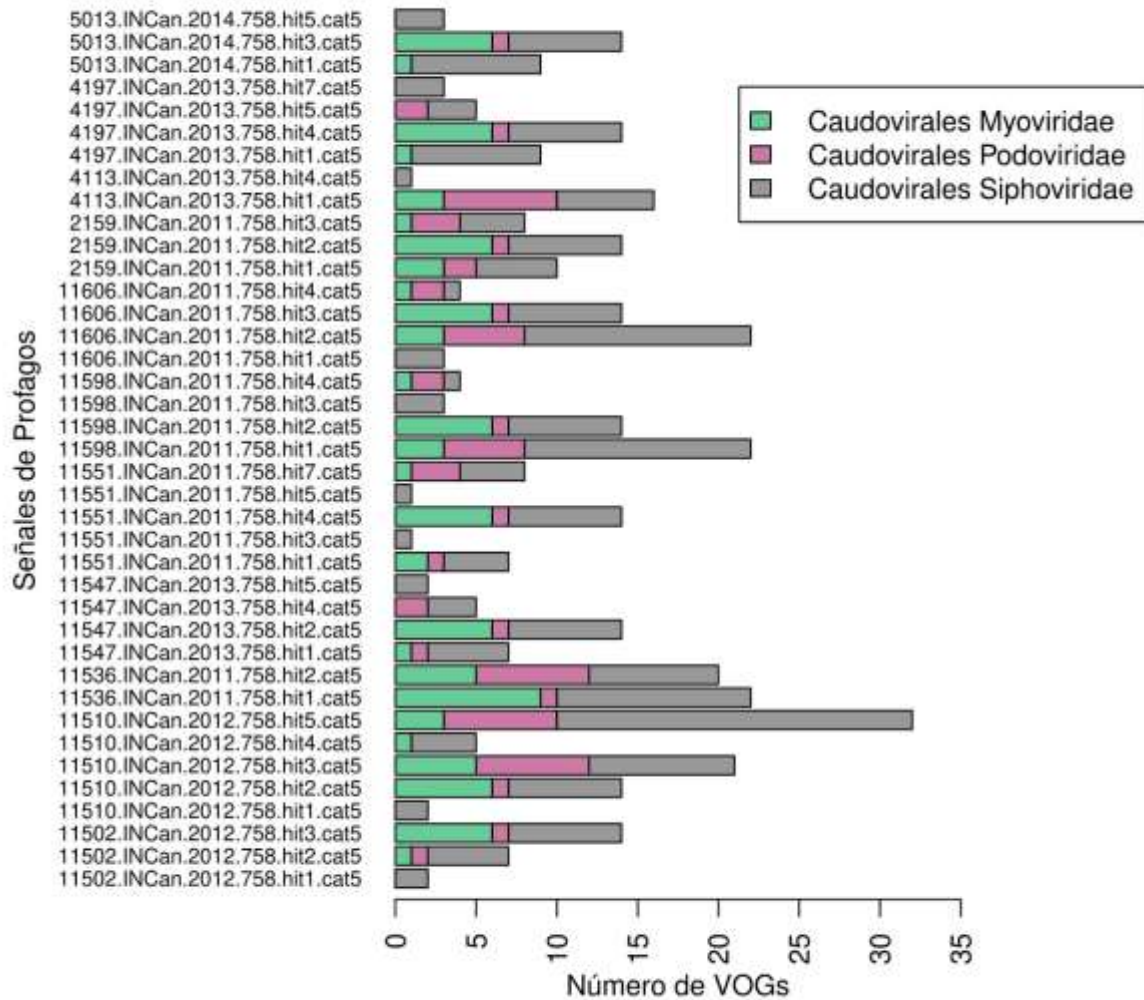


Figura 9. Número total de aciertos obtenidos para cada señal de profago cuestionables(cat5) predicha por VirSorter del INCan (valor E de $\leq 1.0e-15$ y una cobertura de $\geq 80\%$) contra la base de datos VOG. La grafica muestra un código de colores que indican la cantidad de coincidencias significativas de VOGs pertenecientes a Caudovirales Myoviridae(verde), Podoviridae(rosa) y Siphoviridae(gris).

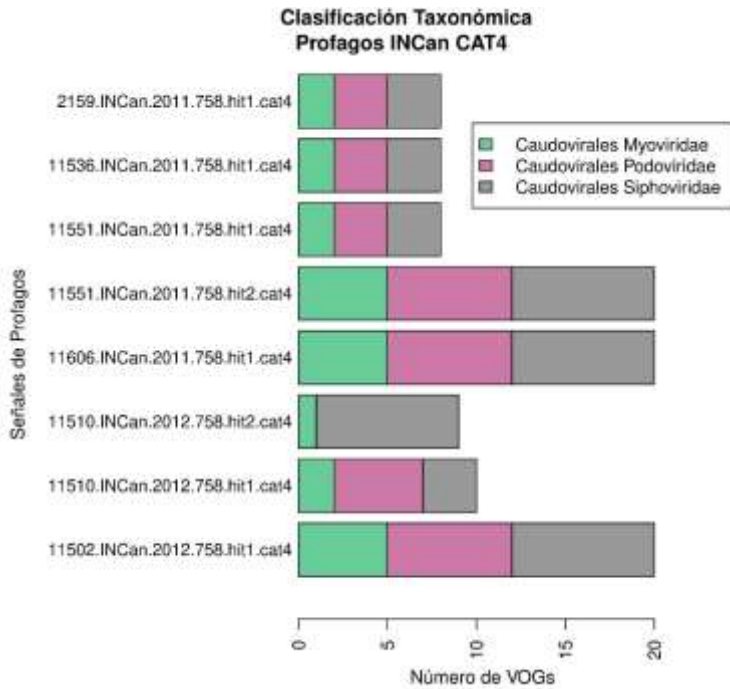


Figura 10. Número total de aciertos obtenidos para cada señal de profago intacta(cat4) predicha por VirSorter del INCan (valor E de $\leq 1.0e-15$ y una cobertura de $\geq 80\%$) contra la base de datos VOG. La grafica muestra un código de colores que indican la cantidad de coincidencias significativas de VOGs pertenecientes a

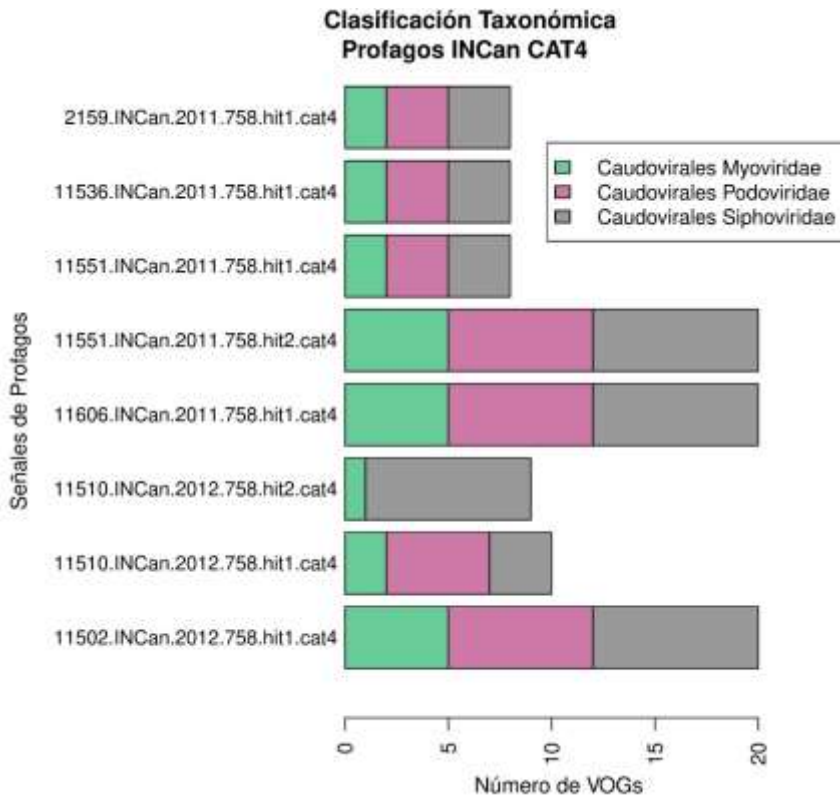


Figura 11. Número total de aciertos obtenidos para cada señal de profago cuestionables(cat2) predicha por VirSorter del INCan (valor E de $\leq 1.0e-15$ y una cobertura de $\geq 80\%$) contra la base de datos VOG. La grafica muestra un código de colores que indican la cantidad de coincidencias significativas de VOGs pertenecientes a Caudovirales Myoviridae(verde), Podoviridae(rosa) y Siphoviridae(gris).

Clasificación Taxonómica Instituto Nacional de Rehabilitación

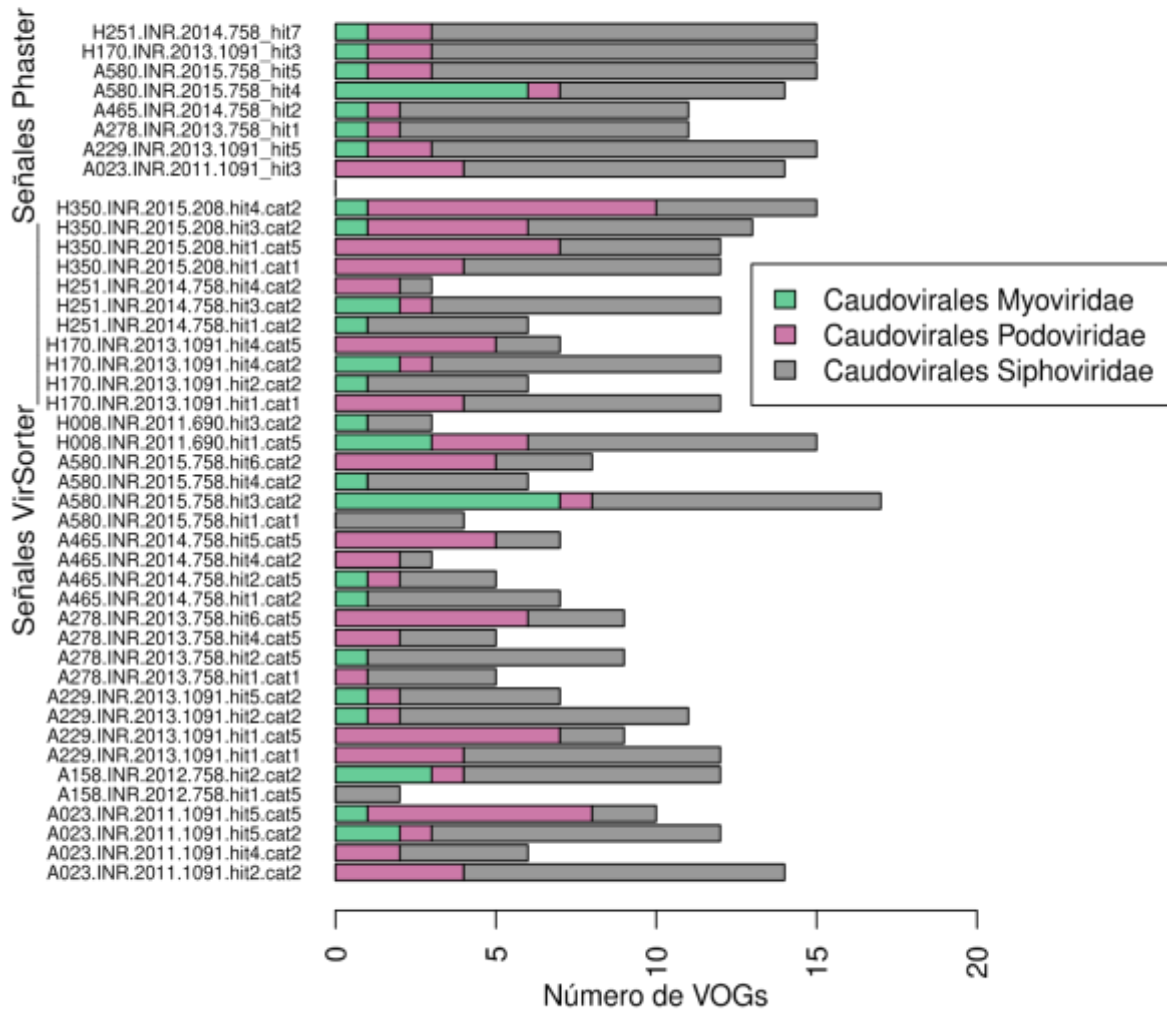


Figura 12. Número total de aciertos obtenidos para cada señal de profago encontrado en las cepas del INR (valor E de $\leq 1.0e-15$ y una cobertura de $\geq 80\%$) contra la base de datos VOG. La grafica muestra un código de colores que indican la cantidad de coincidencias significativas de VOGs pertenecientes a Caudovirales Myoviridae(verde), Podoviridae(rosa) y Siphoviridae(gris).

Clasificación Taxonómica Hospital Infantil

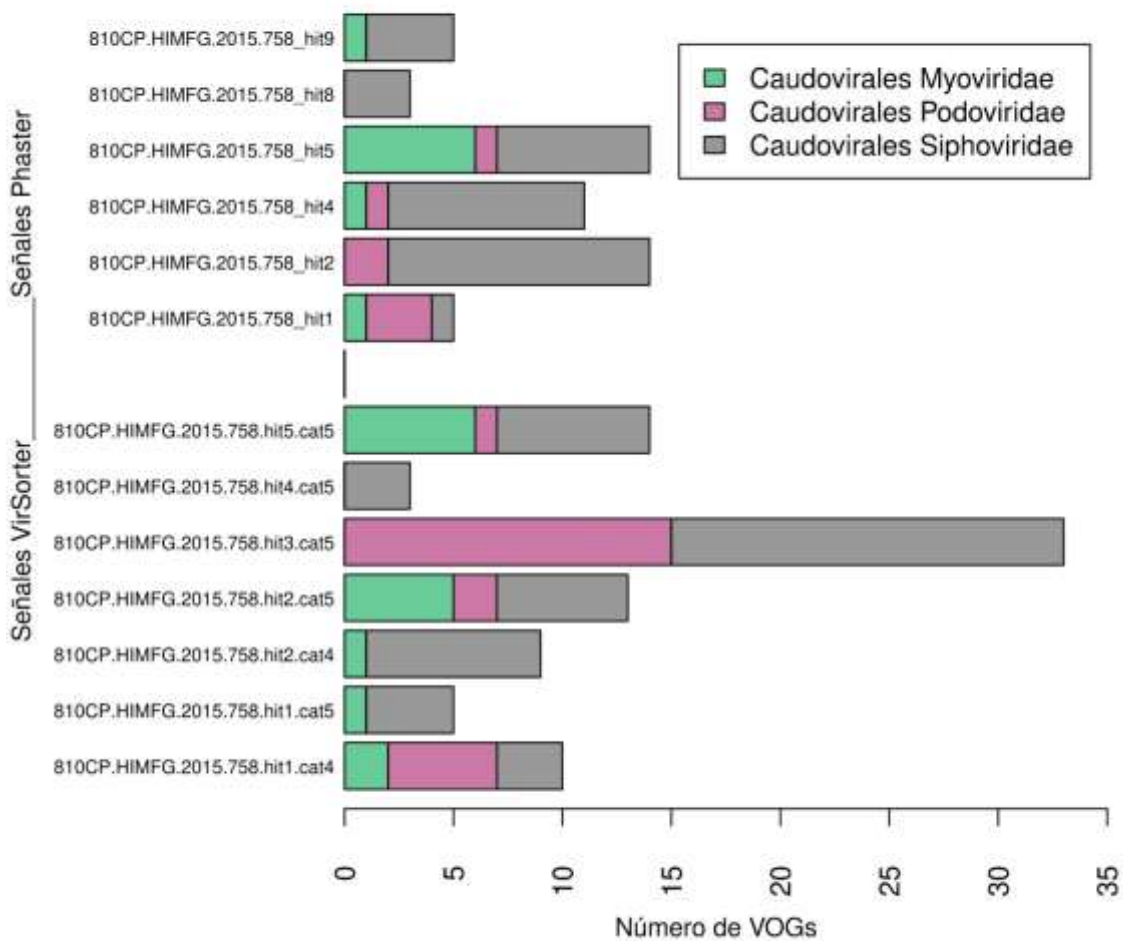


Figura 13. Número total de aciertos obtenidos para cada señal de profago encontrado en las cepas del HIMFG (valor E de $\leq 1.0e-15$ y una cobertura de $\geq 80\%$) contra la base de datos VOG. La grafica muestra un código de colores que indican la cantidad de coincidencias significativas de VOGs pertenecientes a Caudovirales Myoviridae(verde), Podoviridae(rosa) y Siphoviridae(gris).

ASOCIACIÓN DE SEÑALES DE FAGOS CON LOS GENES DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA.

Con el fin de estudiar la relación entre la presencia de profagos y genes de resistencia a antibióticos en los genomas de *A. baumannii*, las coordenadas de los ARGs fueron comparadas con las señales de profago halladas en cada genoma con los programas Phaster y VirSorter (Materiales y métodos). De las señales de profago halladas con ambos programas sólo algunas señales obtenidas con el programa Phaster se encuentran asociadas a genes de resistencia. En total 7 casos fueron hallados, de las cuales 6 pertenecen a profagos encontrados en las cepas del INCan y 1 al HIMFG como se muestra en la tabla 9. En los siete casos el gen de resistencia antimicrobiana *rsmA* se sitúa dentro de las señales de profago de siete genomas distintos, de las cuales, 5 son aislados del 2011. Esto podría indicar una posible introducción del gen *rsmA* a través de HGT mediada por fagos que persistió hasta el 2012. Este mismo gen se encontró asociado a un profago en un aislado en 2015 de *A. baumannii* del HIMFG (Tabla9). Estos datos nos sugieren la introducción del gen *rsmA* a través de transducción de genes en cepas de diferentes hospitales de la ciudad de México.

Cepa	Hospital	Señal de Fago (Pb)	Señal de ARG (Pb)	ARG
11510-2012-758	INCan	CP018861.2: 132-15133	CP018861.2: 14879-15133	rsmA
11551-2011-758	INCan	MSDC01000001.1: 98-20263	MSDC01000001.1: 20009-20263	rsmA
11536-2011-758	INCan	MSCY01000007.1: 42990-63155	MSCY01000007.1: 42990-43244	rsmA
11606-2011-758	INCan	MSDD01000008.1: 69399-122261	MSDD01000008.1: 122007-122261	rsmA
11598-2011-758	INCan	MSCZ01000011.1: 29709-82571	MSCZ01000011.1: 82317-82571	rsmA
810CP-2015-758	HIMFG	CP026338.1: 2825005-2882118	CP026338.1:2877214-2877468	rsmA
2159-2011-758	INCan	SIDE01000021.1: 335605-355770	SIDE01000021. 1: 335605-335859	rsmA

Tabla 9. Relación de señales de fago con ARGs encontrados

DIVERSIDAD Y CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA DE PROFAGOS ASOCIADOS A ARGs.

Con el propósito de saber si las 7 señales de profagos asociadas al gen *rsmA* corresponden al mismo profago o son de profagos diferentes, se llevó a cabo la caracterización de la diversidad y taxonomía de las 7 señales encontradas. Se utilizó el programa VIRIDIC para calcular las similitudes intergenómicas de estos 7 profagos (Fig.14). En donde observamos cierta diversidad entre las 7 señales de profago, con una similitud intergenómica que oscila entre el 39.2-100%, indicando altas similitudes intergenómicas entre algunas de ellas, pero también diferencias claras. La señal de profago 810CP_hit8 del HIMFG presentó una similitud intergenómica del 76.8% y una fracción de alineamiento de 0.9 con las señales de profago 11598_hit3 y 11606_hit3 del INCan. Las 4 señales restantes del INCan mostraron una similitud intergenómica del 49.9-39.2% siendo la señal de profago 11510_hit1 la más lejana. Por otra parte, las señales de profagos 2159_hit5, 11536_hit6 y 11551_hit8 muestran un 100% de similitud intergenómica, así como una fracción de alineamiento de 1 por lo que se puede pensar que es el mismo profago. Finalmente, la señal de profago 11510_hit1 muestra similitudes intergenómicas del 85.3% con estas mismas. Sin embargo, el largo de alineamiento de la señal de profago 11510_hit1 con las señales 2159_hit5, 11536_hit6 y 11551_hit8 es de 1, mientras que, el largo de alineamiento de las señales 2159_hit5, 11536_hit6 y 11551_hit8 con 11510_hit1 es de 0.7. Ya que la señal de profago 11510_hit1 pertenece a la categoría 3 según los criterios de Phaster, se puede inferir que la señal de profago 11510_hit1 se encuentre más degradada que las demás, por lo que las 4 señales podrían tratarse del mismo profago.

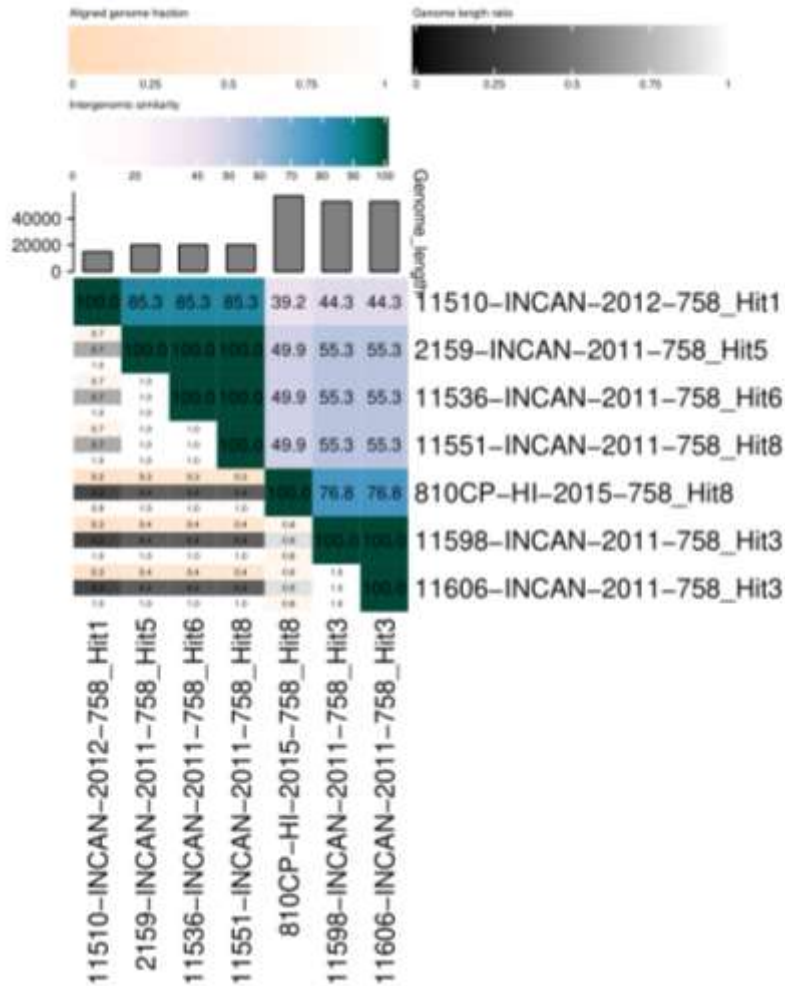


Figura 14. Mapa de Calor de Similitud intergenómica calculada por Viridic. En la esquina superior derecha se muestra el porcentaje de similitud intergenómica. En la esquina inferior izquierda se muestran la fracción de alineamiento y la porción de alineamiento por genoma

Para llevar a cabo la clasificación de la diversidad de las señales de profago asociadas a ARGs se utilizó el programa VICTOR. En este análisis se tomaron las secuencias de nucleótidos de las señales de profagos. Para los resultados de los análisis en esta tesis, se tomaron los árboles filogenéticos basados en la formula GBDP d0. Las 7 señales de profagos analizadas se clasificaron dentro de un mismo nivel taxonómico a nivel de familia y género (F1 G1) y en 4 especies diferentes (S1, S2, S3 y S4). Mostrando poca diversidad entre las señales de profago, excepto a nivel de especie. Lo que nos indica una fuerte relación evolutiva entre estas 7 señales de profagos a pesar de la diferencia geográfica y temporal (Fig. 15).

Las señales de profago 11551_hit8 y 11536_hit6 se encuentran formando el primer grupo, así mismo, ambos se clasifican como S2 G1 F1. Por otra parte, el programa VICTOR considero como genomas duplicados a las señales de profago 2159_hit5 y 11536_hit6, lo que nos podría indicar que los genomas de estas dos señales de profago están altamente relacionados. Al igual que los resultados de VIRIDIC, el programa VICTOR considera a las señales de profago 2159_hit5, 11536_hit6 y 11551_hit8 genéticamente cercanas. VIRIDIC mostro un 100% de similitud integenómica, mientras que VICTOR los clasifico dentro del mismo rango de especie, familia y género (S2 G1 F1). Lo que nos sugiere que estas 3 señales de profagos podrían tratarse de un mismo profago que comparten estas 3 cepas del INCan.



Figura 15. El árbol filogenético producido por Victor fue editado con el programa iTOL para tener una mejor visualización de los resultados relacionando su geografía (última línea de la izquierda), secuencia tipo (círculos pegados a los nombres de los profagos) y temporalidad. Como se mencionó anteriormente, Victor clasifica en categorías taxonómicas a nivel de (S), género (G) y familia (F).

Para evaluar la diversidad de las 7 señales de profago asociadas a ARGs a nivel de aminoácidos, se llevó a cabo un análisis de identidad promedio de aminoácidos (AAI). El análisis arrojó la formación de un grupo con secuencias idénticas y una secuencia (810CP-HIMFG-2015-758_hit8) que se diferencia claramente del grupo (Fig. 16). Así mismo, las secuencias de aminoácidos de las señales de profagos se observan mucho más conservadas entre las señales del INCan, mostrando un 100% de similitud entre ellas. Sin embargo, la señal de profago proveniente del HIMFG tiene un 96% de similitud con las señales de profago 11606_hit3 y 11598_hit3, pero se observa una mayor divergencia con las otras 4 señales de profagos.

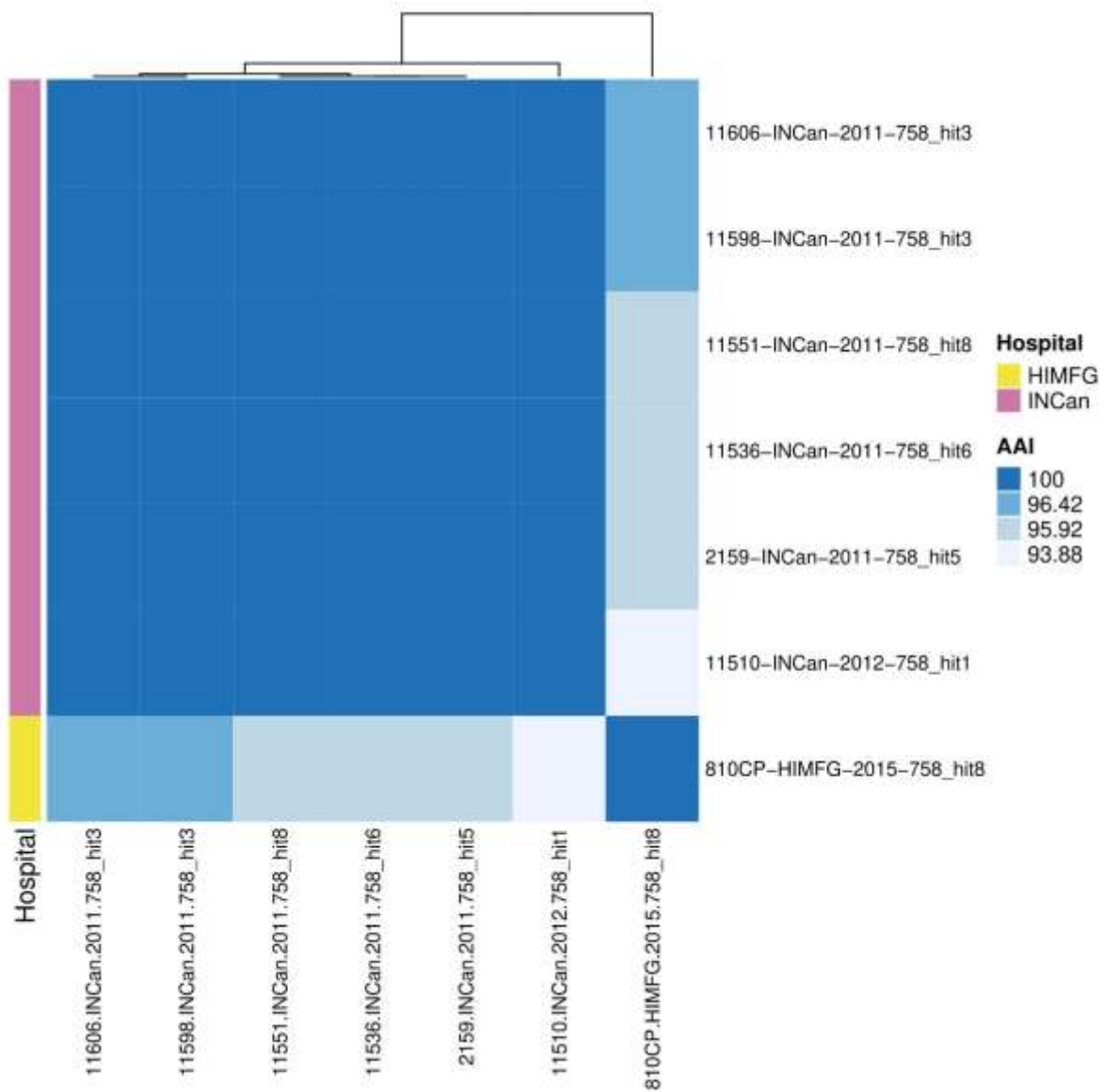


Figura 16. Mapa de calor del análisis de Identidad promedio de aminoácidos (AAI) de las 7 señales de profagos asociadas a genes de resistencia antimicrobianos. La escala va de 0 a 100 aumentando de blanco a azul fuerte. En la barra de la izquierda se indica el hospital al que pertenece cada señal de profago.

La clasificación taxonómica de las 7 señales de profagos asociadas a genes de resistencia antimicrobiana se llevó a cabo con el programa HMMER para hacer una búsqueda de perfiles homólogos con la base de datos de Grupos de Virus Ortólogos (VOG). Todas las señales de profagos fueron caracterizadas dentro del orden

Caudovirales y se dividen en 3 principales familias: *Myoviridae*, *Podoviridae* y *Siphoviridae*.

El 66.7% de los VOGs encontrados pertenecen a *Siphoviridae*, el 22.2% a *Myoviridae* y solo el 11.1% a *Podoviridae*. Las señales de profago 810CP_hit8, 11606_hit3 y 11598_hit3 presentaron un 100% de coincidencias significativas con VOGs pertenecientes a *Siphoviridae*. Mientras que las señales de profago 2159_hit5, 11536_hit6 y 1151_hit3 muestran una variación en las coincidencias significativas de VOGS entre las 3 familias, sin embargo, el número de coincidencias de VOGs *Myoviridae* y *Podoviridae* coinciden entre las señales de profagos 11536_hit6 y 11551_hit3. La señal de fago de la cepa 11510 muestra la misma cantidad de coincidencias significativas de VOGs (2) con las señales de las cepas 2159, 11536 y 11551 correspondientes a *Myoviridae* (Fig. 17).

Los resultados del análisis de similitud intergenómica, clasificación e identidad promedio de aminoácidos mostraron una relación significativa entre los profagos de las 7 diferentes cepas asociadas al gen de resistencia antimicrobiana *rsmA*. Sin embargo, las señales de profagos 2159_hit5, 11536_hit6 y 1151_hit3 muestran una mayor relación entre ellas. Con el programa VIRIDIC se pudo observar un 100% de similitud intergenómica, con el programa VICTOR observamos una cercanía filogenética entre ellas, así como su asignación en el mismo nivel taxonómico (S2 G1 F1), y en la asignación taxonómica observamos una ligera variación entre las coincidencias significativas de VOGs. Sin embargo, las 3 señales de profagos se encontraron asociados a las 3 familias. Estas evidencias podrían indicarnos que se trata de profagos evolutivamente relacionados.

Por otro lado, la señal de profago de la cepa 810CP muestra un parentesco cercano con las señales de profagos de las cepas 11606 y 11598, ya que con VIRIDIC se observó un 76.8% de similitud intergenómica entre ellas y con VICTOR se observó que las 3 señales compartían un mismo ancestro en común. Además, en la asignación taxonómica las tres señales presentaron 3 coincidencias de VOGs de *Siphoviridae*. Estos resultados nos indican que podría tratarse de dos profagos

Clasificación Taxonómica Profagos con señal de ARG

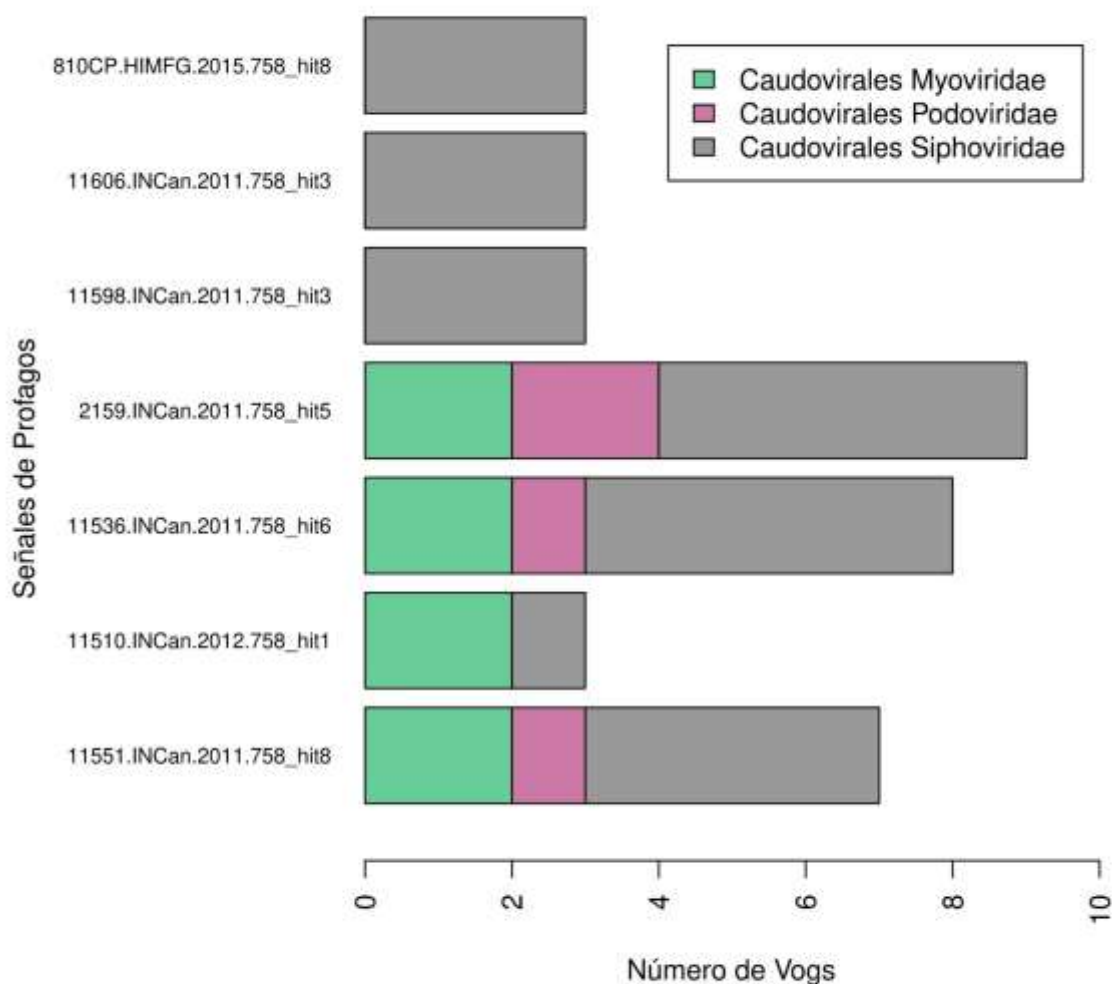


Figura 17. Número total de aciertos obtenidos para cada señal de profago asociada a un gen de resistencia a antibióticos (valor E de $\leq 1.0e-15$ y una cobertura de $\geq 80\%$) contra la base de datos VOG. La grafica muestra un código de colores que indican la cantidad de coincidencias significativas de VOGs pertenecientes a Caudovirales Myoviridae(verde), Podoviridae(rosa) y Siphoviridae(gris).

filogenéticamente emparentados, o bien, ya que las cepas 11606 y 11598 son aislados del 2011 y la cepa 810CP en el 2015 se trate del mismo profago que tras varias infecciones tenga variaciones genéticas.

CONCLUSIONES

La filogenia de ML de las 22 cepas de *A. baumannii* pertenecientes a aislados del HIMFG, INR e INCan indicó una posible diseminación de las cepas pertenecientes al INCan hacia el HIMFG y del INR al INCan. En cada una de las cepas se encontraron entre 3-5 familias diferentes de ARGs lo que indica que estas cepas son MDR, siendo la clase más abundante de ARGs las fluoroquinolonas encontradas en un 30% de los casos. Por otro lado, se encontró una gran cantidad de señales de profagos dentro de dichos aislados. Las señales de profagos seleccionadas de mejor calidad mostraron gran diversidad entre las señales de profago pertenecientes al mismo hospital, así como, la formación de grupos entre las señales de los 3 hospitales. Lo que nos indicaría que los profagos que infectan a las cepas de *A. baumannii* dentro de estos hospitales están evolutivamente relacionados o simplemente ciertas familias de profagos tienden a infectar aislados *A. baumannii* dentro de las zonas hospitalarias. En general, las señales de profago analizadas se clasificaron taxonómicamente dentro del orden *Caudovirales* y se dividen en 3 principales familias *Myoviridae*, *Podoviridae* y *Siphoviridae*. Las 7 señales de profagos asociadas al gen de resistencia antimicrobiana *rsmA*, mostraron una alta similitud entre ellas, lo que nos podría indicar un mismo origen evolutivo. Es importante destacar que, la transferencia horizontal es una de las principales formas por la cual se transfieren los genes de resistencia antimicrobianos; en este sentido, los profagos encontrados en este estudio podrían ser vehículos importantes dentro del intercambio ARGs.

BIBLIOGRAFIA

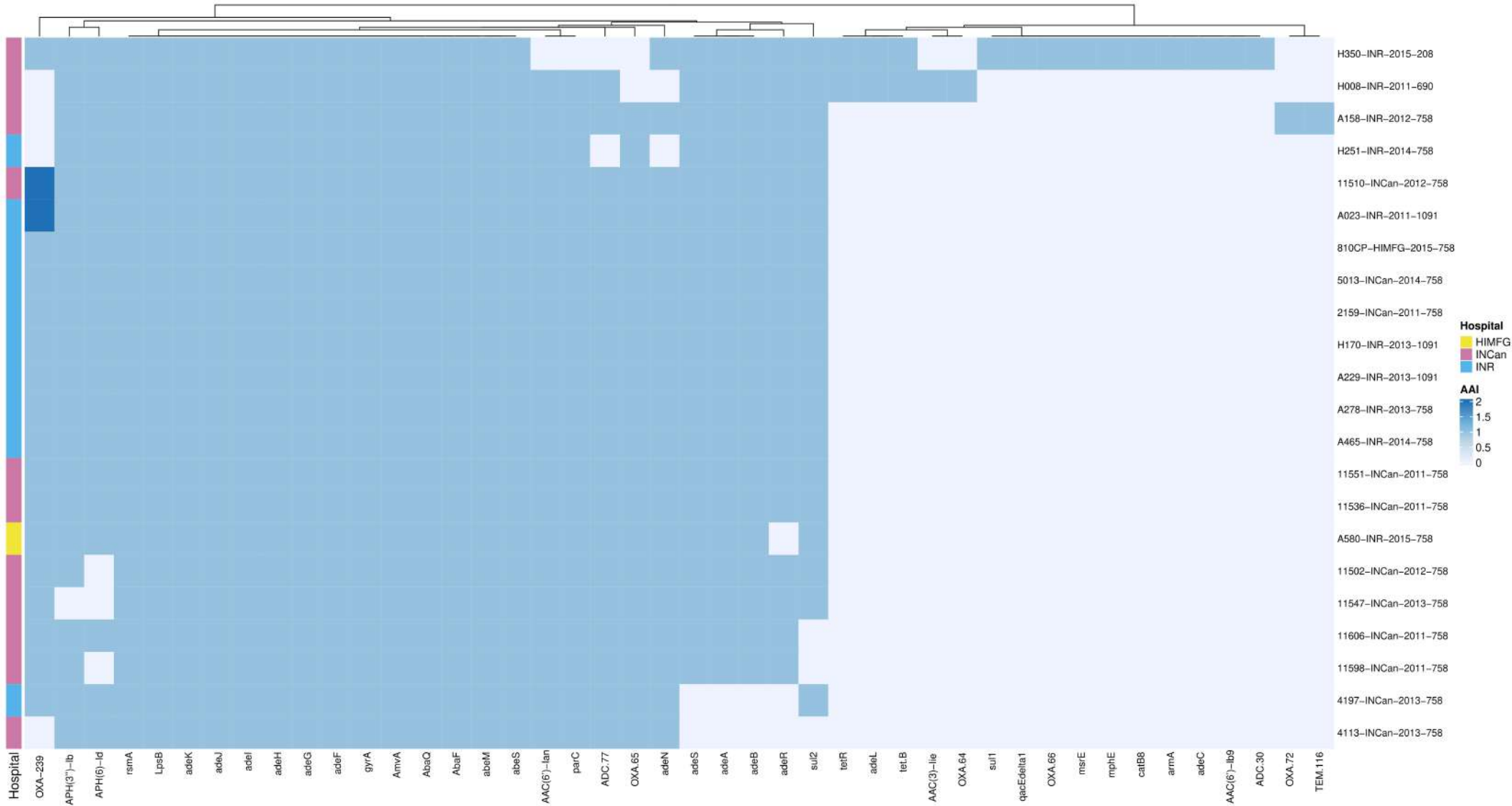
- [1] “Resistencia a los antimicrobianos”. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance> (consultado ene. 11, 2021).
- [2] S. de Salud, “Informes Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE) 2015”, *gob.mx*. <http://www.gob.mx/salud/documentos/informes-rhove-2015> (consultado may 05, 2021).
- [3] C. Ayoub Moubareck y D. Hammoudi Halat, “Insights into *Acinetobacter baumannii*: A Review of Microbiological, Virulence, and Resistance Traits in a Threatening Nosocomial Pathogen”, *Antibiotics (Basel)*, vol. 9, núm. 3, mar. 2020, doi: 10.3390/antibiotics9030119.
- [4] C.-R. Lee *et al.*, “Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options”, *Front Cell Infect Microbiol*, vol. 7, mar. 2017, doi: 10.3389/fcimb.2017.00055.
- [5] P. J. M. Bouvet y P. A. D. Y. 1986 Grimont, “Taxonomy of the Genus *Acinetobacter* with the Recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and Emended Descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 36, núm. 2, pp. 228–240, doi: 10.1099/00207713-36-2-228.
- [6] A. M. Gonzalez-Villoria y V. Valverde-Garduno, “Antibiotic-Resistant *Acinetobacter baumannii* Increasing Success Remains a Challenge as a Nosocomial Pathogen”, *Journal of Pathogens*, vol. 2016, p. e7318075, feb. 2016, doi: 10.1155/2016/7318075.
- [7] A. R. Costa, R. Monteiro, y J. Azeredo, “Genomic analysis of *Acinetobacter baumannii* prophages reveals remarkable diversity and suggests profound impact on bacterial virulence and fitness”, *Sci Rep*, vol. 8, núm. 1, p. 15346, dic. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-33800-5.
- [8] L. Diancourt, V. Passet, A. Nemeč, L. Dijkshoorn, y S. Brisse, “The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool”, *PLoS One*, vol. 5, núm. 4, p. e10034, abr. 2010, doi: 10.1371/journal.pone.0010034.
- [9] S. G. Bartual, H. Seifert, C. Hippler, M. A. D. Luzon, H. Wisplinghoff, y F. Rodríguez-Valera, “Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*”, *J Clin Microbiol*, vol. 43, núm. 9, pp. 4382–4390, sep. 2005, doi: 10.1128/JCM.43.9.4382-4390.2005.

- [10]L. Graña-Miraglia *et al.*, “Origin of OXA-23 Variant OXA-239 from a Recently Emerged Lineage of *Acinetobacter baumannii* International Clone V”, *mSphere*, vol. 5, núm. 1, feb. 2020, doi: 10.1128/mSphere.00801-19.
- [11]P. Cornejo-Juárez *et al.*, “High mortality in an outbreak of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* infection introduced to an oncological hospital by a patient transferred from a general hospital”, *PLOS ONE*, vol. 15, núm. 7, p. e0234684, jul. 2020, doi: 10.1371/journal.pone.0234684.
- [12]A. M. Gonzalez-Villoria *et al.*, “A Multicenter Study in Mexico Finds *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates Belonging to Clonal Complexes 636B (113B) and 92B Harboring OXA-72, OXA-239, and OXA-469”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 60, núm. 4, pp. 2587–2588, abr. 2016, doi: 10.1128/AAC.02042-15.
- [13]R. Zarrilli, S. Pournaras, M. Giannouli, y A. Tsakris, “Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages”, *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 41, núm. 1, pp. 11–19, ene. 2013, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2012.09.008.
- [14]L. Graña-Miraglia *et al.*, “Rapid Gene Turnover as a Significant Source of Genetic Variation in a Recently Seeded Population of a Healthcare-Associated Pathogen”, *Front. Microbiol.*, vol. 8, 2017, doi: 10.3389/fmicb.2017.01817.
- [15]N. A. Lerminiaux y A. D. S. Cameron, “Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments”, *Canadian Journal of Microbiology*, sep. 2018, doi: 10.1139/cjm-2018-0275.
- [16]S. N. Abdi *et al.*, “*Acinetobacter baumannii* Efflux Pumps and Antibiotic Resistance”, *Infect Drug Resist*, vol. 13, pp. 423–434, feb. 2020, doi: 10.2147/IDR.S228089.
- [17]G. López-Leal, R. I. Santamaria, M. Á. Cevallos, V. Gonzalez, y S. Castillo-Ramírez, “Letter to the Editor: Prophages Encode Antibiotic Resistance Genes in *Acinetobacter baumannii*”, *Microb Drug Resist*, vol. 26, núm. 10, pp. 1275–1277, oct. 2020, doi: 10.1089/mdr.2019.0362.
- [18]J. Wachino, W. Jin, K. Kimura, y Y. Arakawa, “Intercellular Transfer of Chromosomal Antimicrobial Resistance Genes between *Acinetobacter baumannii* Strains Mediated by Prophages”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 63, núm. 8, ago. 2019, doi: 10.1128/AAC.00334-19.
- [19]T. Seemann, “Prokka: rapid prokaryotic genome annotation”, *Bioinformatics*, vol. 30, núm. 14, pp. 2068–2069, jul. 2014, doi: 10.1093/bioinformatics/btu153.

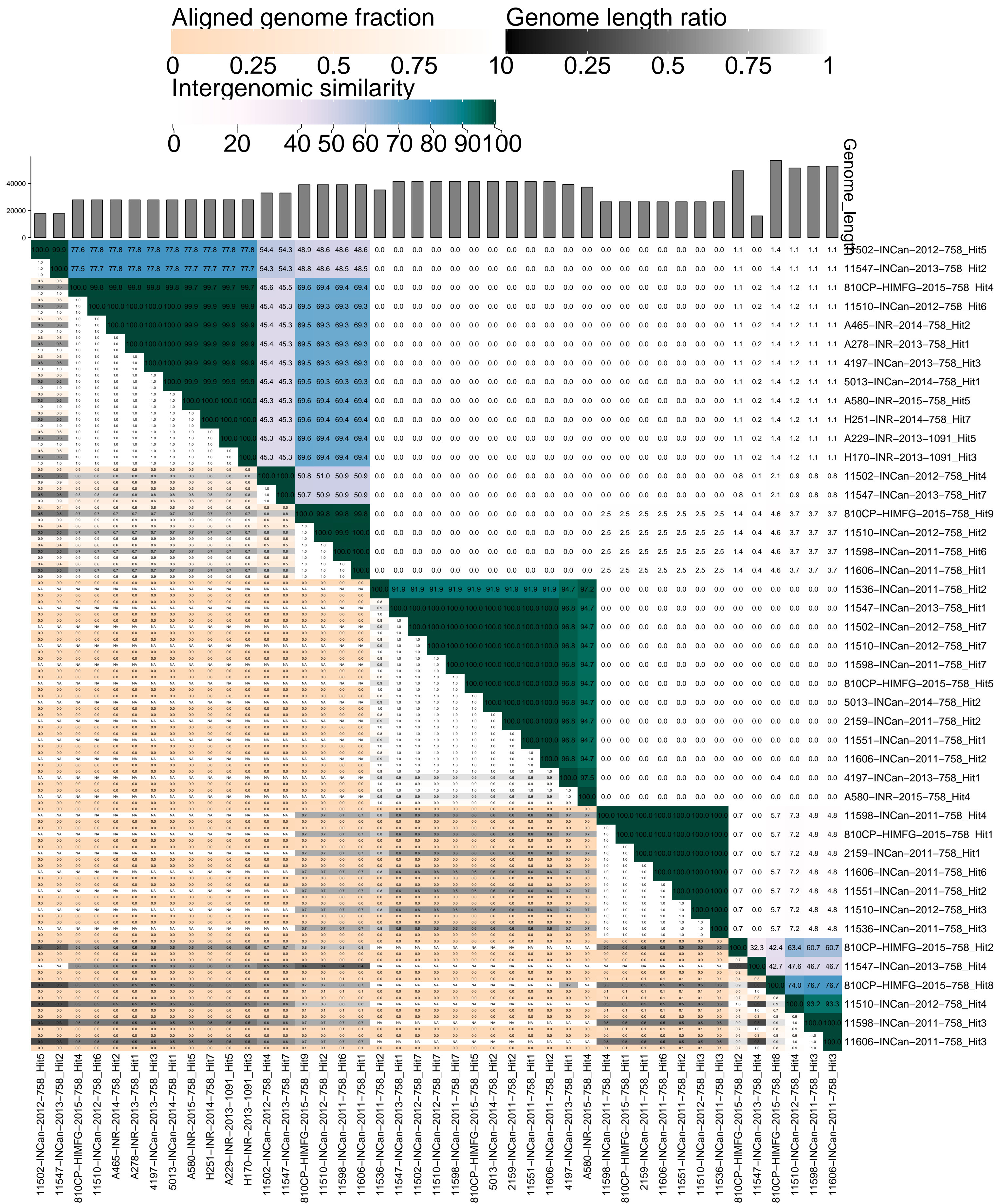
- [20]A. J. Page *et al.*, “Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis”, *Bioinformatics*, vol. 31, núm. 22, pp. 3691–3693, nov. 2015, doi: 10.1093/bioinformatics/btv421.
- [21]R. K. Bradley *et al.*, “Fast Statistical Alignment”, *PLoS Computational Biology*, vol. 5, núm. 5, p. e1000392, may 2009, doi: 10.1371/journal.pcbi.1000392.
- [22]T. C. Bruen, H. Philippe, y D. Bryant, “A Simple and Robust Statistical Test for Detecting the Presence of Recombination”, *Genetics*, vol. 172, núm. 4, pp. 2665–2681, abr. 2006, doi: 10.1534/genetics.105.048975.
- [23]D. Posada y K. A. Crandall, “MODELTEST: testing the model of DNA substitution.”, *Bioinformatics*, vol. 14, núm. 9, pp. 817–818, ene. 1998, doi: 10.1093/bioinformatics/14.9.817.
- [24]A. Stamatakis, “RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models”, *Bioinformatics*, vol. 22, núm. 21, pp. 2688–2690, nov. 2006, doi: 10.1093/bioinformatics/btl446.
- [25]S. Roux, F. Enault, B. L. Hurwitz, y M. B. Sullivan, “VirSorter: mining viral signal from microbial genomic data”, *PeerJ*, vol. 3, p. e985, may 2015, doi: 10.7717/peerj.985.
- [26]D. Arndt *et al.*, “PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool”, *Nucleic Acids Res*, vol. 44, núm. W1, pp. W16-21, jul. 2016, doi: 10.1093/nar/gkw387.
- [27]“Alcock et al . 2020. CARD 2020: vigilancia del resistoma de antibióticos con la base de datos completa de resistencia a los antibióticos. Investigación de ácidos nucleicos, 48, D517-D525.”.
- [28]J. P. Meier-Kolthoff y M. Göker, “VICTOR: genome-based phylogeny and classification of prokaryotic viruses”, *Bioinformatics*, vol. 33, núm. 21, pp. 3396–3404, nov. 2017, doi: 10.1093/bioinformatics/btx440.
- [29]I. Letunic y P. Bork, “Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation”, *Nucleic Acids Research*, vol. 49, núm. W1, pp. W293–W296, jul. 2021, doi: 10.1093/nar/gkab301.
- [30]C. Moraru, A. Varsani, y A. M. Kropinski, “VIRIDIC—A Novel Tool to Calculate the Intergenomic Similarities of Prokaryote-Infecting Viruses”, *Viruses*, vol. 12, núm. 11, Art. núm. 11, nov. 2020, doi: 10.3390/v12111268.
- [31]D. M. Kristensen, A. S. Waller, T. Yamada, P. Bork, A. R. Mushegian, y E. V. Koonin, “Orthologous Gene Clusters and Taxon Signature Genes for Viruses of Prokaryotes”, *J Bacteriol*, vol. 195, núm. 5, pp. 941–950, mar. 2013, doi: 10.1128/JB.01801-12.

[32]T. J. Wheeler y S. R. Eddy, “nhmmer: DNA homology search with profile HMMs”, *Bioinformatics*, vol. 29, núm. 19, pp. 2487–2489, oct. 2013, doi: 10.1093/bioinformatics/btt403.

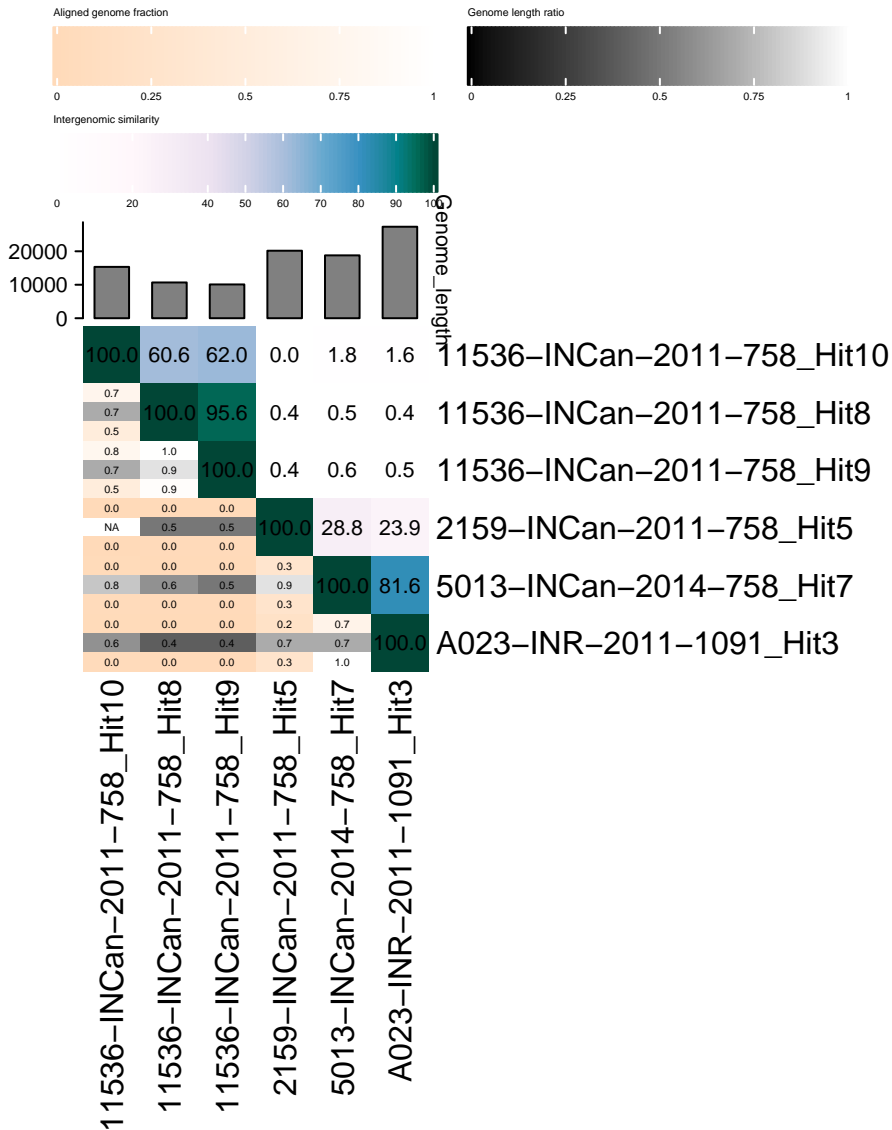
Anexos



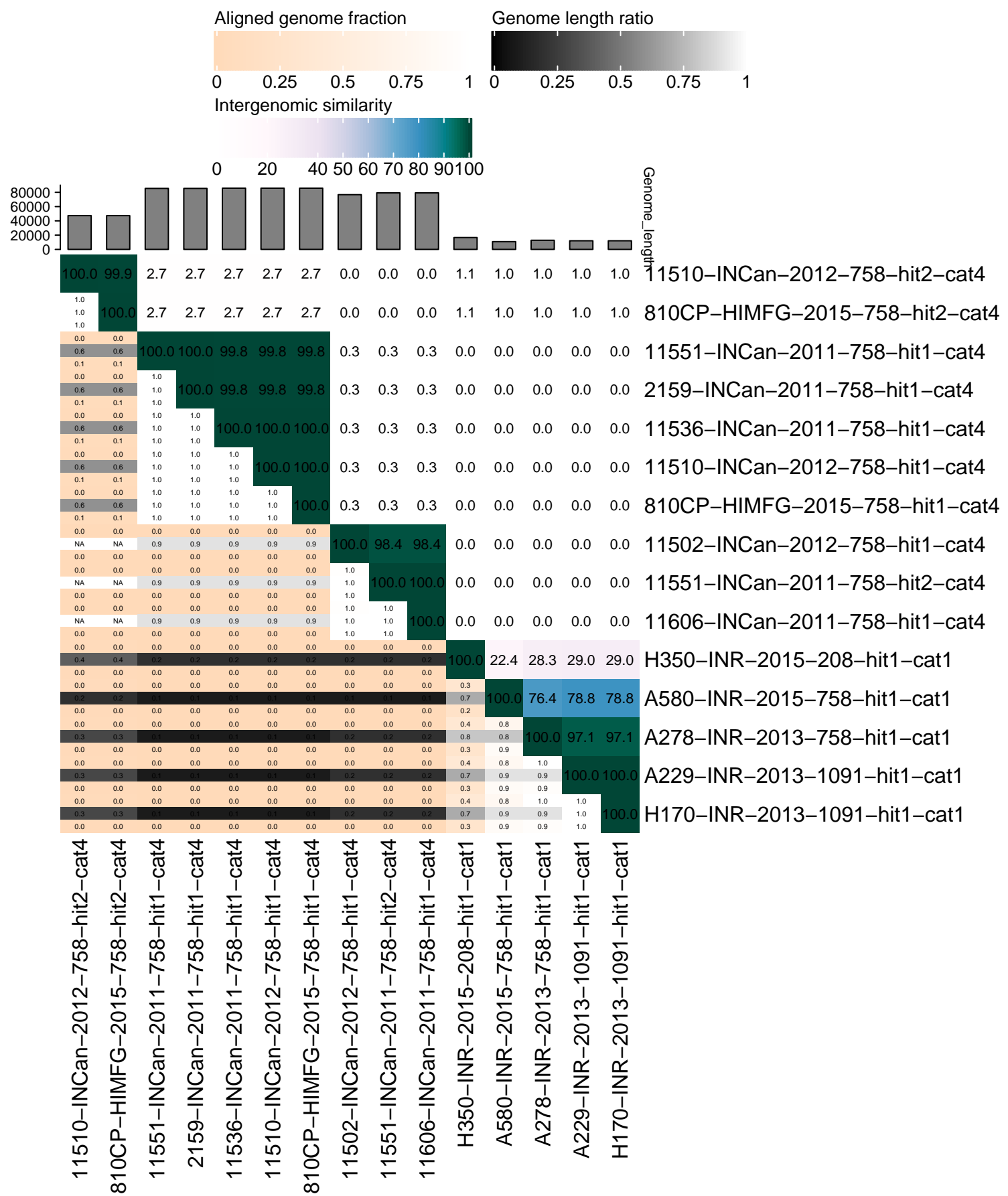
Anexo 1. Mapa de calor de la frecuencia de genes de resistencia encontrados con Card en las 22 cepas de *A. baumannii*.



Anexo 2. Similitud intergenómica de las señales de profagos intactas encontradas por Phaster. La esquina superior derecha muestra las similitudes intergenómicas entre los genomas de los profagos. Mientras que en la esquina inferior izquierda se muestran la fracción de alineamiento y la porción de alineamiento entre los genoma.



Anexo 3. Similitud intergenómica de las señales de profagos cuestionables encontradas por Phaster. La esquina superior derecha muestra el porcentaje de similitud intergenómicas entre los genomas de profagos. Mientras que en la esquina inferior izquierda se muestran la fracción de alineamiento y la porción de alineamiento entre los genoma.



Anexo 4. . Similitud intergenómica de las señales de Profagos intactas encontradas por Virsorter. La esquina superior derecha muestra el porcentaje de similitud intergenómicas entre los genomas de profagos. Mientras que en la esquina inferior izquierda muestra la fracción de alineamiento y la porción de alineamiento entre los genomas.

Aligned genome fraction

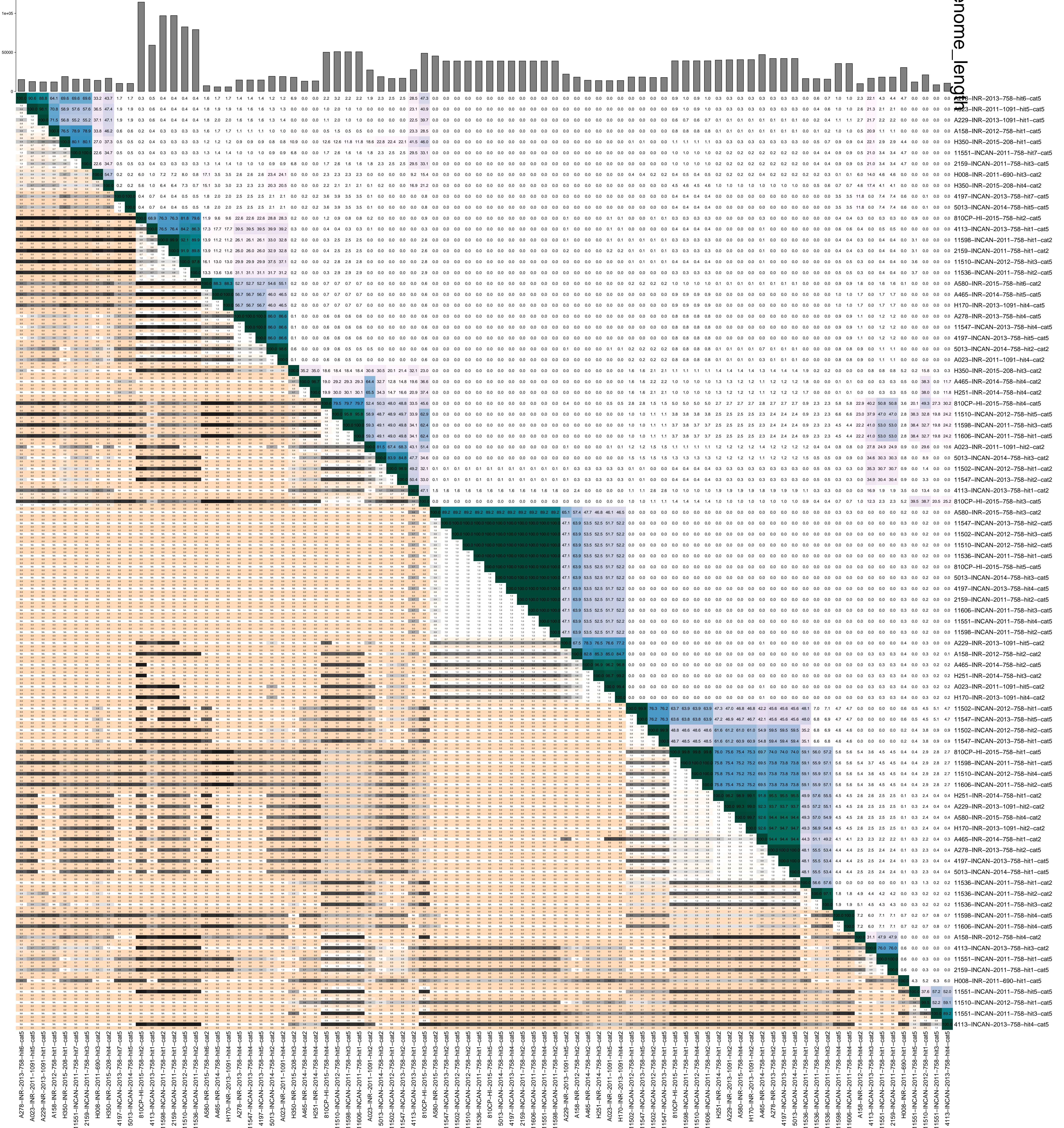
Genome length ratio

0 0.25 0.5 0.75

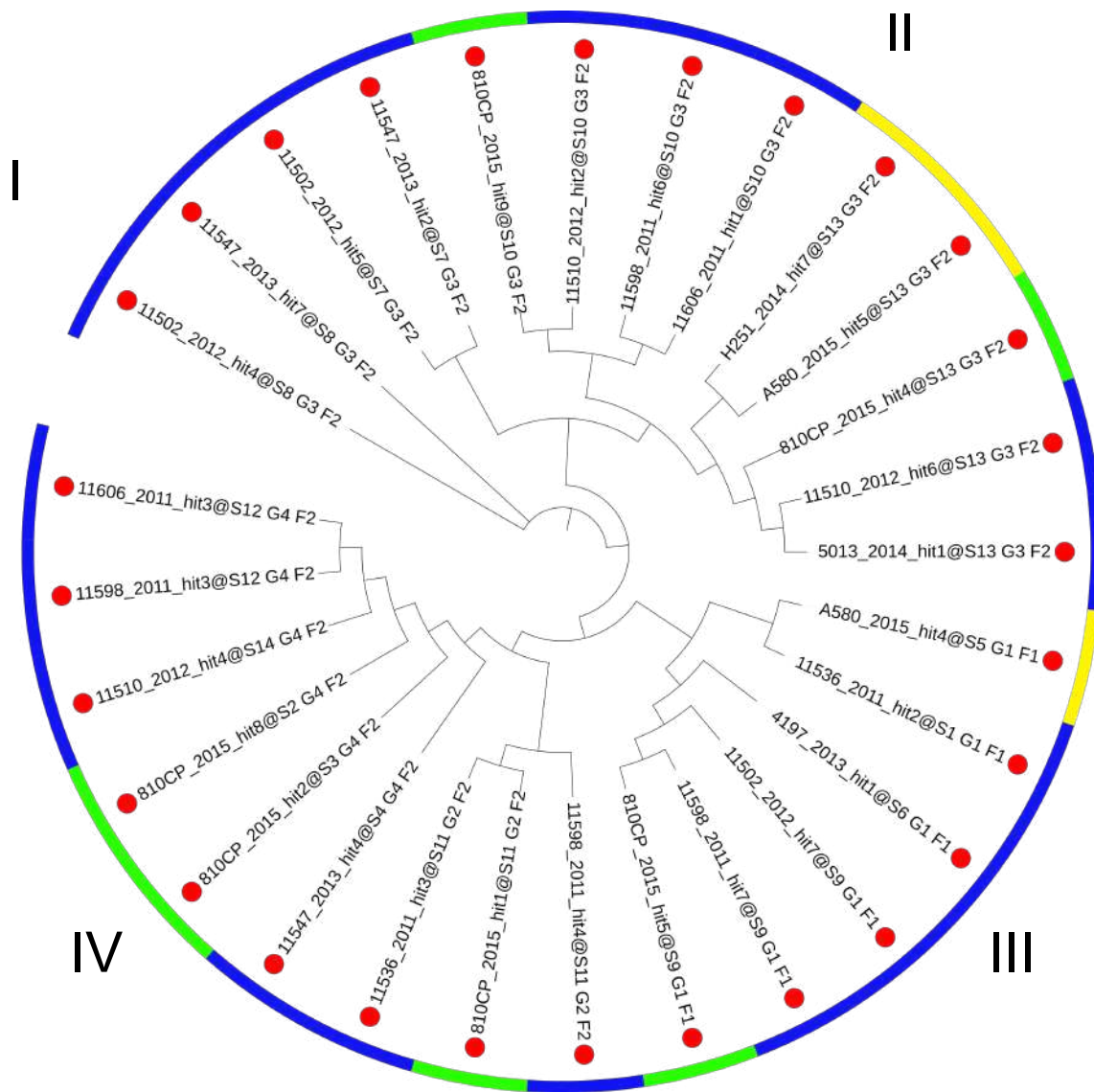
10 0.25 0.5 0.75 1

Intergenomic similarity

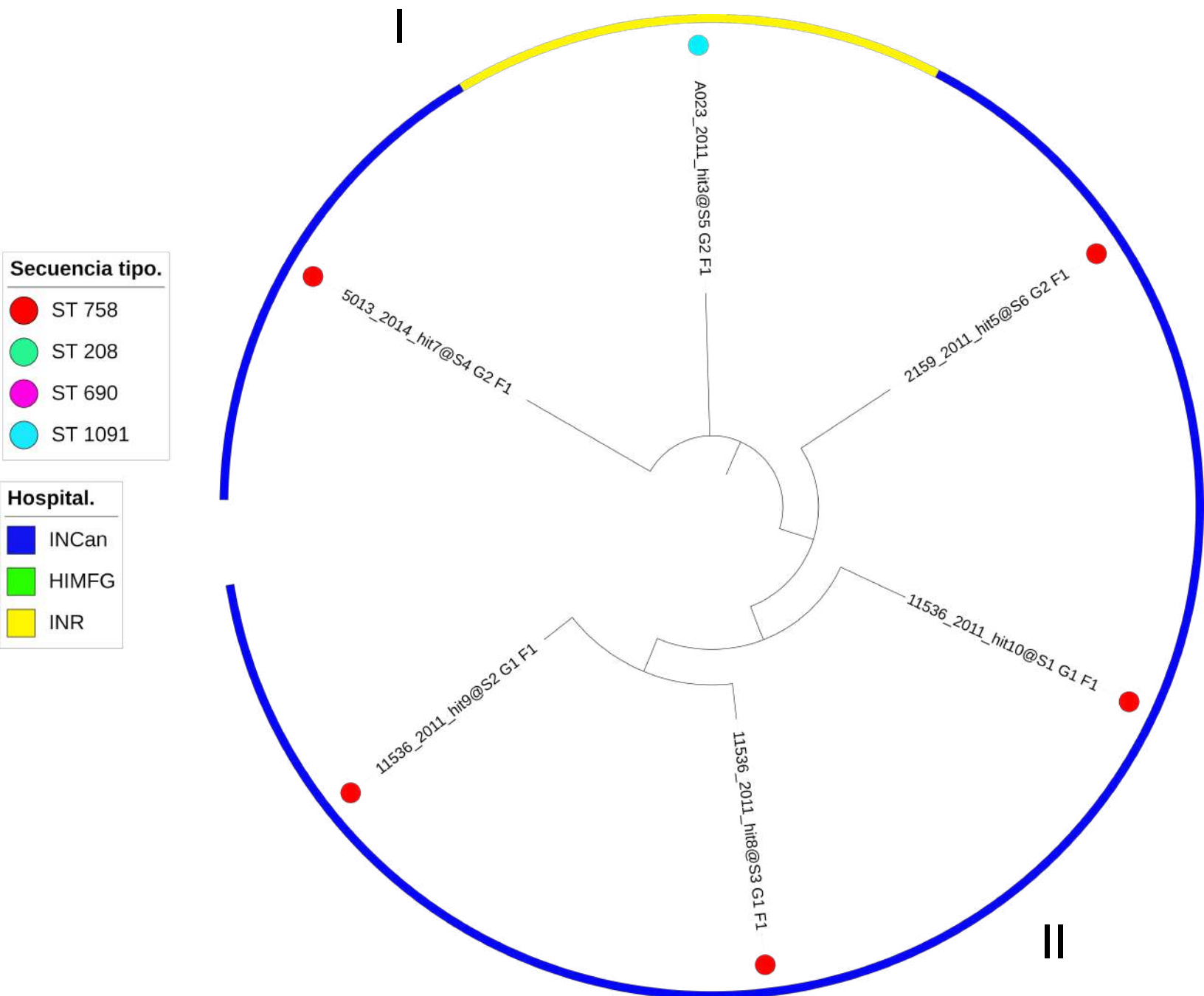
0 20 40 50 60 70 80 90 100



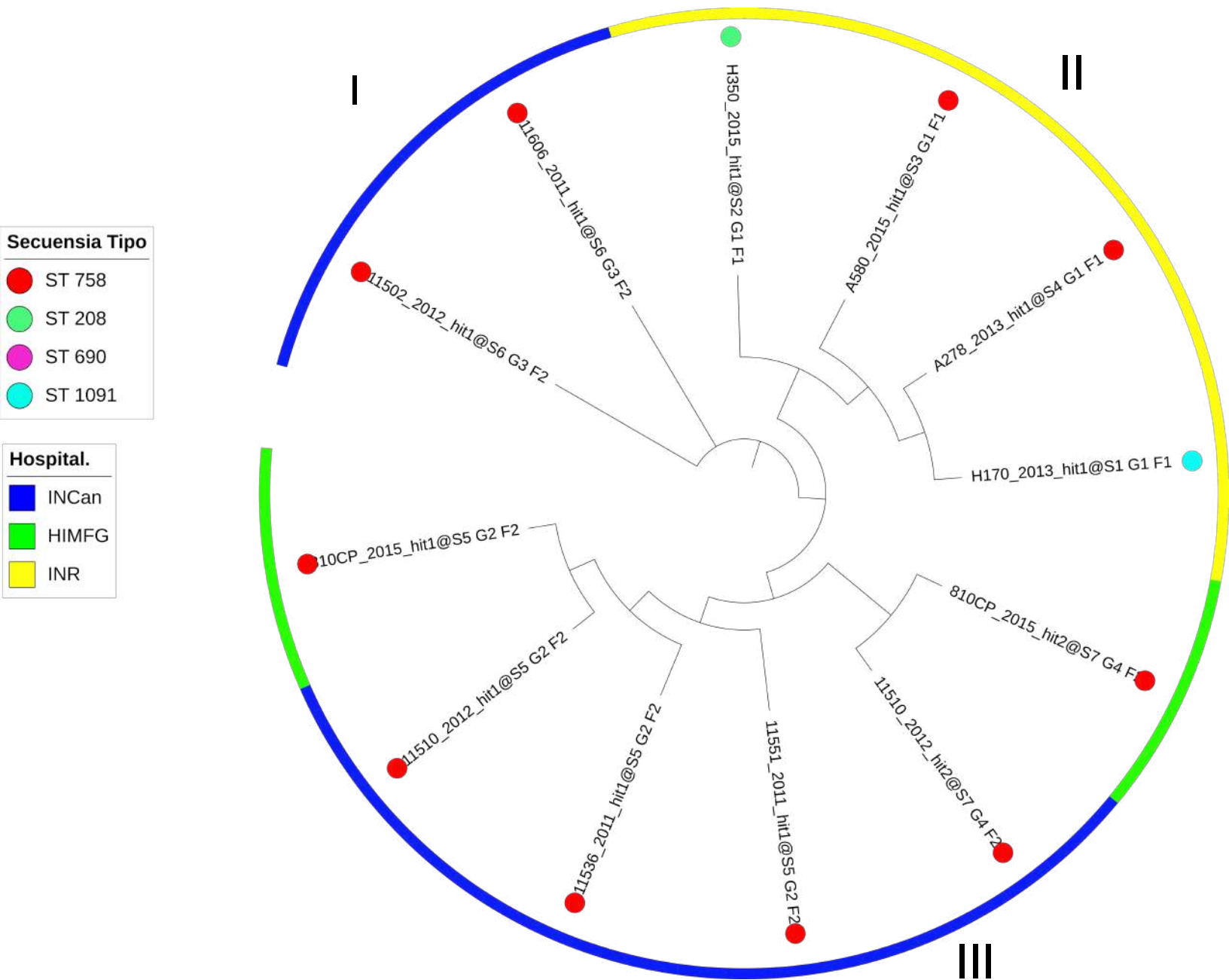
Anexo 5. Similitud intergenómica de las señales de profagos cuestionables encontrados por VirSorter. La esquina superior derecha muestra las similitudes intergenómicas entre los genomas de los profagos. Mientras que la esquina inferior izquierda muestra la fracción de alineamiento y la porción de alineamiento entre los genomas.



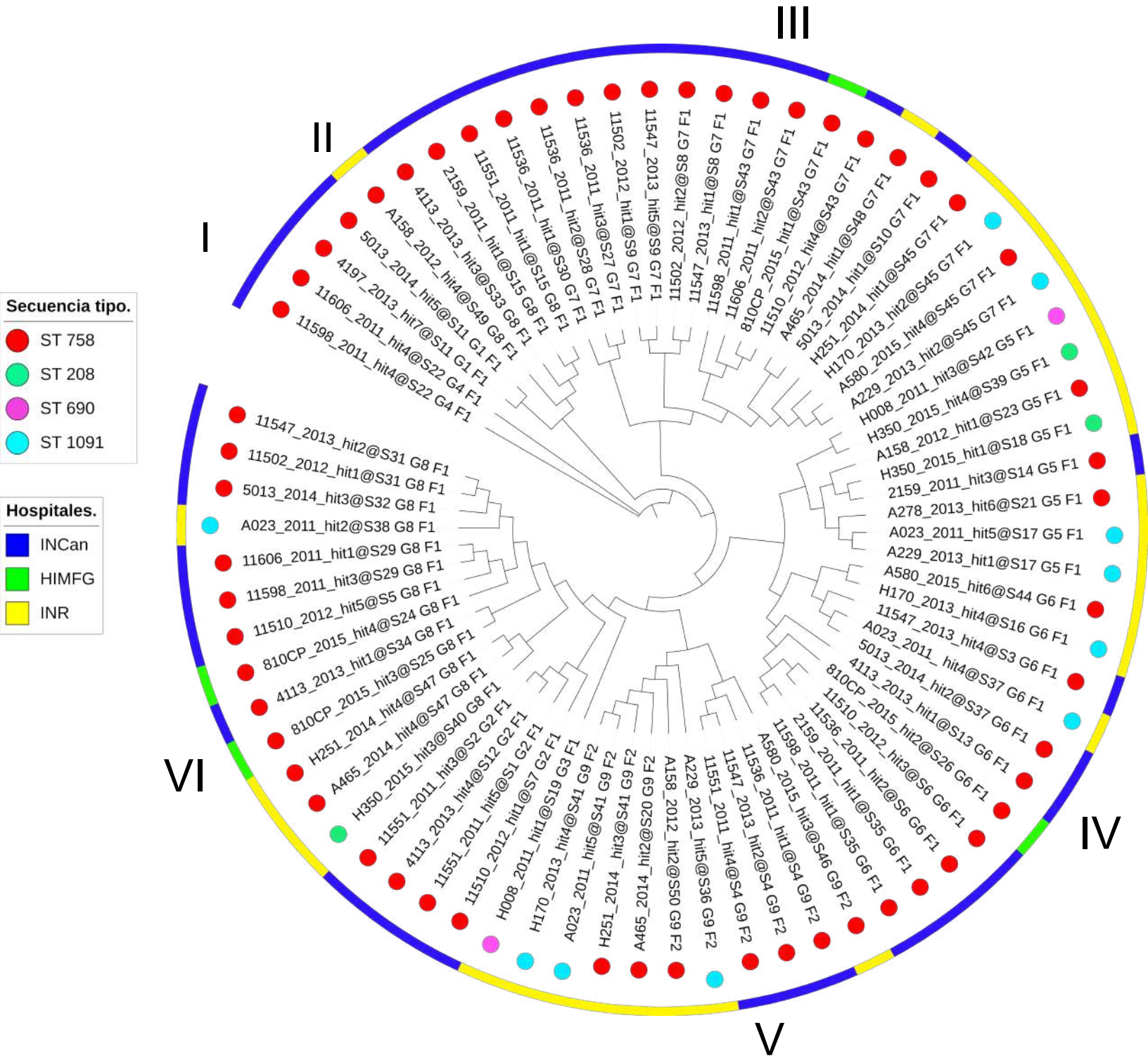
Anexo 6. Árbol filogenético producido por el programa Victor de señales de profago Intactas encontradas por Phaster. Basado en la formuna GBDP D0. Los nombres de las señales de profago muestran la cepa en donde se encontraron, el año de aislamiento y el hit al que pertenecen. Después del signo“@” se encuentra una etiqueta con el nivel de Familia(F), Genero(G) y especie(S) que les asigna Victor. Los círculos muestran la secuencia tipo a la que pertenecen y la franja exterior de colores muestran el hospital al que pertenecen.



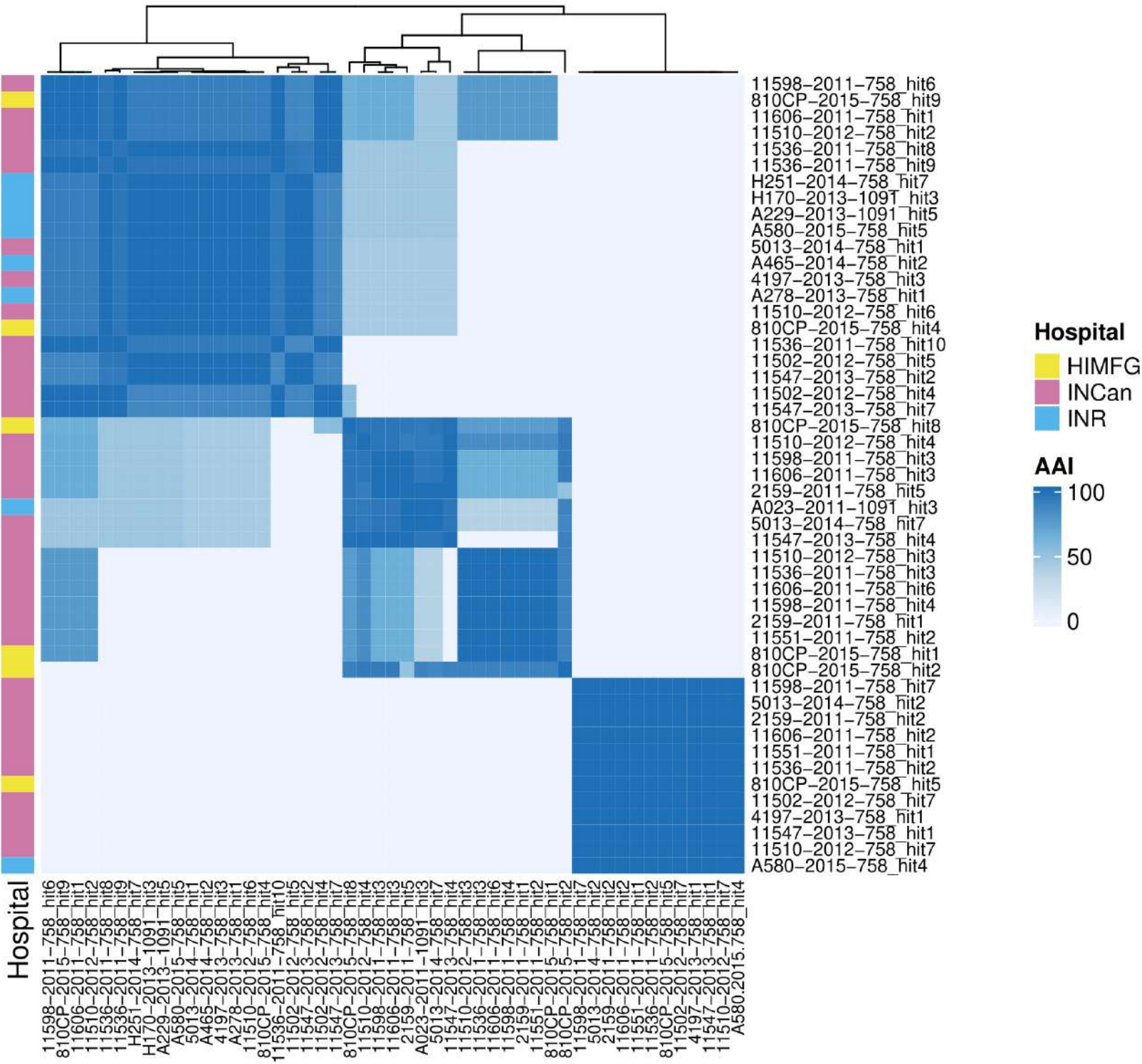
Anexo 7. Árbol filogenético producido por el programa Victor de señales de profago cuestionables encontradas por Phaster. Basado en la formuna GBDP D0. Los nombres de las señales de profago muestran la cepa en donde se encontraron, el año de aislamiento y el hit al que pertenecen. Después del signo“@” se encuentra una etiqueta con el nivel de Familia(F), Genero(G) y especie(S) que les asigna Victor. Los círculos muestran la secuencia tipo a la que pertenecen y la franja exterior de colores muestran el hospital al que pertenecen.



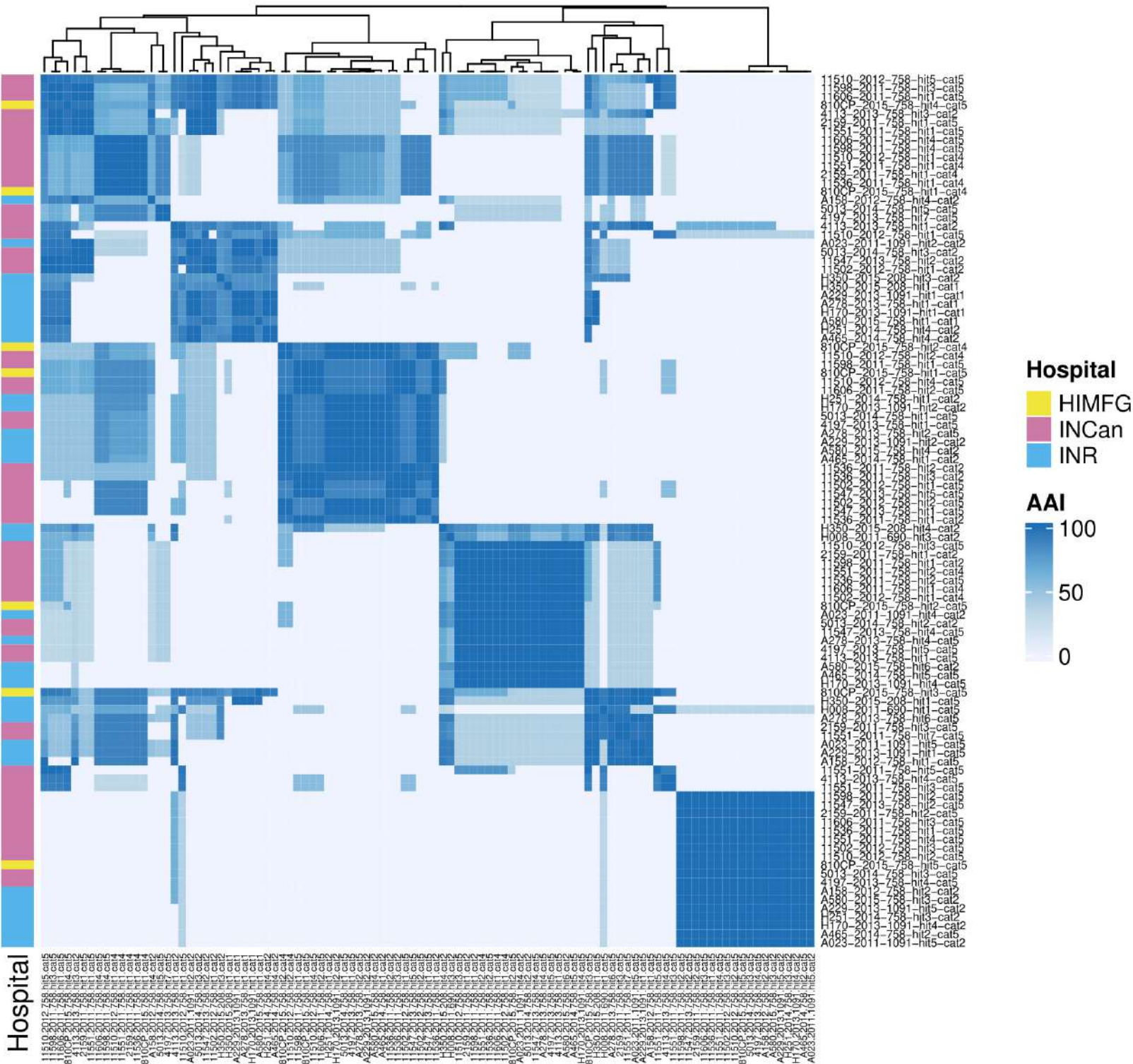
Anexo 8. Árbol filogenético producido por el programa Victor de señales de profago intactas encontradas por VirSorter. Basado en la formuna GBDP D0. Los nombres de las señales de profago muestran la cepa en donde se encontraron, el año de aislamiento y el hit al que pertenecen. Después del signo“@” se encuentra una etiqueta con el nivel de Familia(F), Genero(G) y especie(S) que les asigna Victor. Los círculos muestran la secuencia tipo a la que pertenecen y la franja exterior de colores muestran el hospital al que pertenecen



Anexo 9. Árbol filogenético producido por el programa Victor de señales de profago cuestionables encontradas por VirSorter. Basado en la formata GBDP D0. Los nombres de las señales de profago muestran la cepa en donde se encontraron, el año de aislamiento y el hit al que pertenecen. Después del signo "@" se encuentra una etiqueta con el nivel de Familia(F), Genero(G) y especie(S) que les asigna Victor. Los círculos muestran la secuencia tipo a la que pertenecen y la franja exterior de colores muestran el hospital al que pertenecen.



Anexo 10. Mapa de calor del Analisis de Identidad promedio de aminoacidos(AAI) de las 49 señales de profagos predichas por el programa Phaster. Los valores oscilan de 0 a 100 aumetando de blanco a azul fuerte.En la barra de la izquierda se indica el hospital al que pertenece cada señal de profago.



Anexo 11. Mapa de calor del Analisis de Identidad promedio de aminoacidos(AAI) de las 102 señales de profagos predichas por el programa VirSorter. Los valores oscilan de 0 a 100 aumetando de blanco a azul fuerte. En la barra de la izquierda se indica el hospital al que pertenece cada señal de profago.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

Control Escolar de Licenciatura



VOTOS DE APROBATORIOS

Secretaria Ejecutiva del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
P r e s e n t e .

Por medio de la presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó la C. **KAREN NOHEMI TENORIO CARNALLA** con número de matrícula **10003026** cuyo título es:

“Caracterización in silico de profagos de aislados de Acinetobacter baumannii provenientes de hospitales de la Ciudad de México”.

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **LICENCIADO EN CIENCIAS ÁREA TERMINAL DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

Cuernavaca, Mor a 11 de mayo del 2022

Atentamente
Por una universidad culta

Se adiciona página con la e-firma UAEM de los siguientes:

Dr. Ramón González García-Conde	(Presidente).
Dr. Armando Hernández Mendoza	(Secretario).
Dr. Santiago Castillo Ramírez	(Vocal).
Dr. Ismael Luis Hernández González	(Suplente).
Dra. Sonia Dávila Ramos	(Suplente).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

RAMON ANTONIO GONZALEZ GARCIA CONDE | Fecha:2022-05-20 11:19:58 | Firmante

v33bA8bvciiEqKscGaY0wOGCYyoLxzSZV4ewoV8ytLe+aKqLCoEzoDkMqFWIHpQQX6+vlpkZQVF+gJfKv/HPTusBy8WlqBHOSh7yJ/p5RNNoxG4XbzDLKXOU65qvCexqb/MFm SCTyW9KKFmCQuiM50eKFX4MWcZnzzlBOPGcfffBSoEJDxiolGhTGZqccfFBVwPMh8Z9fVMJWcfcQ2qftx9ooanli5ntnFk5A40AVeeYHMduVSVGlv6Khj3RPt6vBVI5jKXs1Pz55zCuHL0twWiOoD3f69u2X0fs8vbl2zsu0zyOVJDsbOsJBrZMgtA8u+f+a4hia+868kCjwHkvp0Q==

ARMANDO HERNANDEZ MENDOZA | Fecha:2022-05-20 12:04:43 | Firmante

mJGcyYK07pt3sSzrlQKqx/QpKbZQoobQJPuKkr4+q/MGi6onAxiQ+c/LH8mVYxSKOSaxX/9TqNwp4PYuGgVbcXixp/83UcdlxssaD3Rhgg5iu4w+fQ1x9R1pmeZ89Qz7vF2nDc84KvZu5TXreJ/xqt6d8VqkwSXUXSi4+B3b+YP5XaseThz/tt3Cv1UJ37o8rR36CqcvrtxUrP5f/TU8vdui38j4gLW9m62yqOCaEGOPLbnU/vpgggT7NRy4cUD3WgT6emdSHIhm1EI3YQDIN/YCma4XUzo+Unb+yN4TT4xwaqeQxcSB1ZgWKhvS0Z4Gnr2suNJQmPZfy78HcEw==

SANTIAGO CASTILLO RAMÍREZ | Fecha:2022-05-20 12:19:13 | Firmante

j3YDyDDD0N0w68XCyvt7HcuORIu1AVVp+jGwLyNc0+AMMsleyEiy9TIQ9ZK8Zda5dlXtbb5UQNnFg7GAxsohbjXKz71cYTEidWNquQ4NIhL0gm4ACR0fU6aFNViAQXgKy4y/lliOfODI6HLORGE8vagTn6LCg3UIWpCjQgZXLMLJQrcIUyoThMav1KUqVc5KNCf9dhdJaqGaWqKAQtmr3XoXbX3Y27qDgygLu4cROLluMi9rSagms6uf0qMoqjb+0HQ53ooaEH5yk8OteSq8d9bXcoZ6DrU/9aiwlhaJWzOISADAmQwG9Sw86dYCd4VlelAkYRBdy8sGds8yWLhw==

ISMAEL LUIS HERNÁNDEZ GONZÁLEZ | Fecha:2022-05-20 14:59:27 | Firmante

TWP0rC8/NnS3Ey8O+Z911Xck8pbmDLNqNB+xbiN+SwddpottB6p99Lp1eAE6y6LJSfq6BukR2i5MG6MV8N5sJJE0wASnXmxFPiQH1MNucTGaleFhJmt0+oih7qEIR3CjNpV6gY9x1eIAe7DKXqp01kANW2FxeAq0sfd2btTLhffwOe/GvjXF40uULw8H3byUtAaTKP58HJ8TdjyEhRFH6mtl8loLzPzH8/37RijucgG95yT+7urG504Uhs6eOjh+2LTniHf5ZCCQHMP2ofggfeaQmSPXG0orttqIdbJJAzYmWFJcXm59epBrXE8wlKzEErej8mNk6f31wgQLECAA==

SONIA DAVILA RAMOS | Fecha:2022-05-24 12:08:34 | Firmante

D4PUM/R47tUIEou4auSzC/T3Lz9QYi0MYG2hHmey3bb3cFFxLIwEUMVVLhCsZ+/rMQHxa+CjnBro+P1T0PQC6rl/UXk7x8KmhUKfmlELvy6WwCX9Fj1mAyq6vvl8uZ21ssRUM8r9eFxlkclMqXegiZYy/lp1lqvVMCjwGcWOBQMF6Nxxvt7PUUehiYNGu+ej+oilNpQGx6pply/djGND5x7ld/zcx9ZldVHrkNMWdQeobx8qHUOND5PyHVAZ2rZqyXo+niDIQQ6LJSZns2l6L7/o4LPpMNAvagtYFWAsrSLnU8J6NMTRwkrh3JdGZ9bVnk10bprjW6ZMQryxRTaw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



UjDKQpSVq

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Dayeydjsam866i5jLNaYxF3uZs44tv>

