

Caracterización de nuevos factores de  
virulencia del patógeno nosocomial  
*Acinetobacter baumannii*

Laura Álvarez Fraga

---

Tesis doctoral

Enero 2018

Directores: Dra. Margarita Poza Domínguez, Dr. Alejandro Beceiro Casas y  
Dr. Germán Bou Arévalo

Tutora: Dra. Margarita Poza Domínguez

Programa de doctorado en Biología Celular y Molecular

Instituto de Investigación Biomédica A Coruña (INIBIC)-Complejo Hospitalario  
Universitario A Coruña-Universidad de A Coruña



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



Los directores de esta tesis doctoral, la **Dra. Margarita Poza Domínguez**, Doctora en Biología por la Universidad de Santiago de Compostela e Investigadora del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña, el Dr. **Alejandro Beceiro Casas**, Doctor en Ciencias Biológicas por la Universidad de A Coruña e Investigador del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña y el **Dr. Germán Bou Arévalo**, Doctor en Ciencias Biológicas por la Universidad Autónoma de Madrid, Jefe de Servicio de Microbiología del Complejo Hospitalario Universitario A Coruña (CHUAC) y profesor asociado de la Universidad de Santiago de Compostela

**CERTIFICAN:**

Que Dña. Laura Álvarez Fraga, Licenciada en Biología por la Universidad de Santiago de Compostela, ha realizado en el Servicio de Microbiología y en el Instituto de Investigación Biomédica (INIBIC) del Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, bajo su dirección y tutela, el trabajo **“Caracterización de nuevos factores de virulencia del patógeno nosocomial *Acinetobacter baumannii*”**, el cual, reúne todas las condiciones para ser presentado como Tesis Doctoral.

Y para que así conste, y surta los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en A Coruña, Enero del 2018.

Dra. Margarita Poza  
Domínguez  
Directora  
Tutora

Dr. Alejandro Beceiro  
Casas  
Director

Dr. Germán Bou Arévalo  
Director



**A mi abuelo**



# Agradecimientos

---

En este momento, sentada delante del ordenador dispuesta a ponerme a escribir los agradecimientos me llegan de golpe una mezcla de sentimientos. Alegría, porque la tesis se acaba y puedo ver el resultado final de tanto esfuerzo y horas de trabajo y a la vez tristeza, porque empieza una nueva etapa y dejo a atrás (espero que por poco tiempo) a la gran familia de científicos que hice en Coruña. Pero no puedo terminar esta etapa sin darles las gracias a todas aquellas personas que ayudaron a que llegara hasta aquí, porque sin ellas nunca lo hubiera conseguido.

En primer lugar, darles las gracias a mis tres directores de tesis. A Germán, por darme la oportunidad de iniciarme en el mundo de la ciencia. A Alex, por tu enorme apoyo y dedicación y enseñarme a pensar y razonar por mí misma. Y por supuesto a Marga, la mejor codi del mundo. Gracias por confiar en mí desde el principio, porque todo lo que sé es gracias a ti y por ser mucho más que una jefa.

A mis compañer@s del labo, aunque realmente son mucho más que eso. Daros las gracias por la maravillosa acogida que recibí al llegar a Coruña ya que, a pesar de no conocer a nadie, hicisteis que me sintiera como en casa. Tengo que hacer mención especial a ciertas personas y voy a empezar por Juancar y Marta, porque gran parte de este trabajo les pertenece. Gracias por estar siempre dispuestos a ayudar (aunque sean las 8 de la tarde). Porque tanto fuera como dentro del labo sois unos compis de 10, un poco optimistas con los horarios, pero sin duda los mejores. A Soraya, por ser una mamá pata estupenda en mis inicios científicos y enseñarme con esa paciencia que te caracteriza, además de por ser de las pocas personas que me acompañan sin quejarse a los festis costras. A Meri, porque a pesar de quedar asustada mi primer día de trabajo con tu frase coruña “voy a por jalufa”, fuiste de las primeras personas que intentó integrarme. A Astrid, porque la mejor terapia para los días de estrés y bajón es tu risa discreta y tus innumerables batallitas y *Astrizadas*. A Mariló, por aguantarme durante casi 24 horas al día, por todas las tardes de sofá, manta, serie y Burger King, pero sobre todo, por enseñarme la expresión “es bien”. A Eva, porque tus hipótesis ilógicas y tu exageración y finura natural alegran el día a cualquiera. Anita, agradecerte tu sinceridad sin filtro y porque en parte esta tesis está escrita gracias a tu pregunta matutina, ¿Qué tal la tesis? ¿Acabaste de escribir? A MJ, mi personal shopper, porque eres capaz que en

# Agradecimientos

---

cada boda a la que vaya consiga que todo el mundo piense que soy una persona con un gran estilo y elegancia. A Silvia, porque no se puede ser más detallista y mejor persona. Además de ser una súper anfitriona y la mejor guía de la Playa de las Catedrales. A Clara, por ser una compi de piso genial y por todas las noches de The Walking Dead en el frigo-piso de Astrid. A Juan, el hombre sabio, siempre dispuesto a dar consejos y buenas ideas. A Carlos, Patri, Kelly, Begoña, Maricuchi, Miriam, Mariki, Laura F, Lucia... Gracias por hacer que las miles de horas que pasé en el laboratorio fueran a la vez las más divertidas.

Al equipo Val Miñor Fiestón por todos los fines de semana de desconexión que provocaban que llegase el lunes al laboratorio más cansada que el viernes. En particular a Chover que, aunque a veces aflora el enanito gruñón que llevas dentro, siempre consigues animarme y hacerme reír.

A Loreto, por ser la mejor amiga que podría tener. Porque aunque a veces me caes un poco mal (cuando subes 3000 fotos al Facebook sin filtro), me encanta la habilidad que tienes para liarme en tus planes locos y absurdos.

A mis padres adoptivos Tere y Carlos. Por acogerme con los brazos abiertos cuando llegué a Coruña y tratarme como a una hija. A mis padres por apoyarme siempre en todas mis decisiones, por enseñarme a ser fuerte y a seguir adelante y nunca renunciar a mis sueños y metas. A mis hermanas, porque sé que puedo contar con vosotras para cualquier cosa y porque gracias a vosotras la Ruta de los Pueblos Blancos no fue tan horrible como podría haber sido. A Choni, por cuidarme y preocuparte por mí desde que nací. A mi abuelo, por ser un ejemplo de esfuerzo y dedicación. Porque hay personas que nacen para ser científicos y tú eres una de ellas.

Y para acabar, a Gabri, porque aunque fuera desde el extranjero, tu apoyo fue imprescindible durante todos estos años. Gracias por transmitirme tu tranquilidad y buen humor en los momentos que más los necesitaba y sobre todo por estar siempre a mi lado.

**GRACIAS A TODOS**



ABREVIATURAS .....	15
RESUMO.....	19
RESUMEN.....	21
ABSTRACT .....	23
I. INTRODUCCIÓN .....	27
1. El género <i>Acinetobacter</i> spp. ....	28
1.1. Características taxonómicas.....	28
1.2. Identificación de especies .....	29
1.3. Reservorios.....	31
2. El patógeno <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	32
2.1. Importancia clínica del patógeno <i>A. baumannii</i> .....	33
3. Mecanismos de resistencia de <i>A. baumannii</i> .....	35
4. Patogénesis y factores de virulencia en <i>A. baumannii</i> .....	38
4.1. Factores de virulencia .....	39
4.1.1. Proteínas de membrana externa.....	40
4.1.2. Lipopolisacárido y polisacárido capsular .....	41
4.1.3. Fosfolipasas .....	42
4.1.4. Vesículas de membrana externa .....	42
4.1.5. Proteínas de unión a la penicilina.....	43

# Índice

---

4.1.6. Sistemas de secreción .....	43
4.2. Movilidad bacteriana .....	44
4.3. Adherencia y formación de <i>biofilm</i> .....	46
4.3.1 Pili de tipo chaperona-usher .....	49
4.3.2. Proteínas de membrana.....	51
4.3.3. Polisacáridos de superficie .....	52
4.3.4. Sistemas de secreción .....	53
4.3.5. Quorum sensing .....	54
4.4. Sistemas de captación de hierro.....	54
4.4.1 Captación del grupo hemo .....	55
4.4.2. Captación de hierro férrico. Sideróforos.....	57
4.4.3 Captación de hierro ferroso. Sistemas Feo .....	59
II. OBJETIVOS .....	67
III. CAPÍTULOS.....	71
Capítulo I. Secuenciación y análisis del genoma de la cepa clínica <i>A. baumannii</i> MAR002 hiperproductora de <i>biofilm</i> . .....	71
Resumen .....	71
Artículo.....	73
Capítulo II. Análisis del papel del gen LH92_11085 en la patogénesis de <i>A. baumannii</i> MAR002.....	75

Resumen.....	75
Artículo.....	77
Material suplementario .....	91
Capítulo III. Implicación del gen <i>feoA</i> en la patogénesis de <i>A. baumannii</i> . .....	95
Resumen.....	95
Artículo.....	97
Material suplementario .....	139
IV. DISCUSIÓN .....	147
V. CONCLUSIONES .....	165
VI. BIBLIOGRAFÍA .....	169
VII. <i>CURRICULUM VITAE</i> .....	197



## ÍNDICE DE FIGURAS

### Figuras de la introducción

Figura 1. Micrografía realizada mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) de <i>A. baumannii</i> MAR002. ....	32
Figura 2. Representación de las etapas del desarrollo del <i>biofilm</i> .....	47
Figura 3. Esquema del (a) P pilus y del (b) pilus tipo I de <i>Escherichia coli</i> . ....	50
Figura 4. Representación esquemática de la vía de captación del grupo hemo y del hierro férrico a través de sideróforos.....	57
Figura 5. Representación esquemática del sistema de captación de hierro ferroso Feo de <i>E. coli</i> .....	60

## ÍNDICE DE TABLAS

### Tablas de la introducción

Tabla 1. Listado de los microorganismos que pertenecen al grupo ESKAPE .....	33
Tabla 2. Principales mecanismos de resistencia de <i>A. baumannii</i> . ....	38
Tabla 3. Principales factores de virulencia descritos en <i>A. baumannii</i> . ....	39



## ABREVIATURAS

<b>ACB</b>	<i>A. calcoaceticus-A. baumannii</i>
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AFLP</b>	Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados ( <i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> )
<b>AHL</b>	N-acil homoserín lactona
<b>ARDRA</b>	Análisis de restricción del ADN ribosómico amplificado ( <i>Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis</i> )
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>ARNr</b>	Ácido ribonucleico ribosómico
<b>ARNt</b>	Ácido ribonucleico transferente
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>BAP</b>	Proteína asociada al biofilm ( <i>Biofilm-associated protein</i> )
<b>DHBA</b>	Ácido dihidroxibenzoico ( <i>Dihydroxybenzoic acid</i> )
<b>GAP</b>	Proteína activadora de la actividad GTPasa ( <i>GTPase-activating protein</i> )
<b>GDI</b>	Inhibidor de la disociación a GDP ( <i>Guanine nucleotide dissociation inhibitor</i> )
<b>GEF</b>	Factor intercambiador de nucleótido de guanina ( <i>Guanine nucleotide exchange factor</i> )

# Abreviaturas

---

<b>G+C</b>	Guanina + Citosina
<b>IC</b>	Clon internacional ( <i>International clone</i> )
<b>IDSA</b>	Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas ( <i>Infectious Diseases Society of America</i> )
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>Mb</b>	Megabase
<b>MALDI-TOF</b>	Desorción/ionización mediante láser asistida por matriz – tiempo de vuelo ( <i>Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight</i> )
<b>MS</b>	Espectrometría de masas (Mass spectrometry)
<b>NGS</b>	Secuenciación de segunda generación ( <i>Next generation sequencing</i> )
<b>OMP</b>	Proteína de membrana externa ( <i>Outer membrane protein</i> )
<b>OMS</b>	Organización mundial de la salud
<b>OMV</b>	Vesículas de membrana externa ( <i>Outer membrane vesicles</i> )
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBP</b>	Proteína de unión a la penicilina ( <i>Penicillin binding protein</i> )
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase chain reaction</i> )
<b>PCR-ESI-MS</b>	PCR ligada a Espectrometría de masas tipo ionización por electrospray ( <i>PCR electrospray ionization-mass spectrometry</i> )
<b>PNAG</b>	poly- $\beta$ -(1-6)-N -Acetilglucosamina
<b>SEM</b>	Microscopía electrónica de barrido ( <i>Scanning Electron Microscopy</i> )



# Abreviaturas

---

<b>spp</b>	Especies
<b>sRNA</b>	Molécula pequeña de ARN
<b>T2SS</b>	Sistema de secreción tipo II
<b>T5SS</b>	Sistema de secreción tipo V
<b>T6SS</b>	Sistema de secreción tipo VI
<b>TEM</b>	Microscopía electrónica de transmisión ( <i>Transmission Electron Microscopy</i> )
<b>UCI</b>	Unidad de Cuidados Intensivos



## RESUMO

*Acinetobacter baumannii* é un patóxeno oportunista que xurdiu nos últimos anos como un dos microorganismos máis perigosos dentro do ambiente hospitalario. Na presente tese doutoral caracterizáronse dous novos factores de virulencia que poderían explicar parcialmente a habilidade que ten *A. baumannii* para causar unha infección.

O xene LH92\_11085 de *A. baumannii* MAR002, implicado na formación dun pilus tipo chaperona-usher, atopouse sobreexpresado en células do *biofilm* en comparación con células planctónicas. A inactivación deste xene resultou nunha redución na capacidade da cepa de formar *biofilm* e de adherirse a células epiteliais e nun descenso na virulencia.

O xene A1S\_0242 (*feoA*) da cepa *A. baumannii* ATCC 17978, que está implicado na captación de ferro e que se atopou sobreexpresado durante un proceso de pneumonía, xoga un papel na adhesión, na formación de *biofilm*, na resistencia ó estrés oxidativo e na virulencia in vivo.

Todos os resultados obtidos durante esta tese doutoral demostraron a contribución destes xenes na patoxénese de *A. baumannii*.



## RESUMEN

*Acinetobacter baumannii* es un patógeno oportunista que ha emergido en los últimos años como uno de los microorganismos más peligrosos dentro del ambiente hospitalario. En la presente tesis doctoral se caracterizaron dos nuevos factores de virulencia que podrían explicar parcialmente la habilidad que tiene *A. baumannii* para causar una infección.

El gen LH92\_11085 de *A. baumannii* MAR002, implicado en la formación de un pilus tipo chaperona-usher, se encontró sobreexpresado en células del *biofilm* en comparación con células planctónicas. La inactivación de este gen resultó en una reducción en la capacidad de la cepa de formar *biofilm* y de adherirse a células epiteliales y un descenso en la virulencia.

El gen A1S\_0242 (*feoA*) de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978, que está implicado en la captación de hierro y que se encontró sobreexpresado durante un proceso de neumonía, juega un papel en la adhesión, la formación de *biofilm*, la resistencia al estrés oxidativo y en la virulencia *in vivo*.

Todos los resultados obtenidos durante esta tesis doctoral demostraron la contribución de estos genes a la patogénesis de *A. baumannii*.



## ABSTRACT

*Acinetobacter baumannii* is an opportunist pathogen that has emerged in the last years as one of the most dangerous microorganisms living in hospital environments. In the present work two new virulence factors, that could partially explain the ability of *A. baumannii* to cause an infection, have been characterized.

The LH92\_11085 gene of the *A. baumannii* MAR002 strain, involved in the formation of a chaperone-usher pilus system, was found as over-expressed in biofilm cells compared to planktonic cells. The inactivation of this gene resulted in a reduction in the capacity of the MAR002 strain to form biofilm and to adhere to human epithelial cells and in a decrease in virulence.

The A1S\_0242 gene (*feoA*) from the *A. baumannii* ATCC 17978 strain, which is involved in iron uptake and that was found as over-expressed during the course of a pneumonia infection, plays a role in adhesion, biofilm formation, resistance to oxidative stress and in virulence.

Data obtained in this work demonstrate the contribution of both genes to the pathogenesis of *A. baumannii*.





# INTRODUCCIÓN



## I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas representan un grave problema sanitario debido a la elevada morbilidad y a los costes económicos que suponen para el sistema sanitario. A pesar de los grandes progresos en el conocimiento de la epidemiología, etiología, patología, profilaxis y tratamiento, las infecciones continúan teniendo una prevalencia elevada.

El descubrimiento de la penicilina en 1928 supuso un hito en la historia de la medicina y un antes y un después en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Desde entonces, se han descrito una gran cantidad de nuevas moléculas antibióticas que han permitido reducir la morbilidad y mortalidad asociada a las infecciones bacterianas. Sin embargo, en las últimas décadas el descubrimiento y desarrollo de nuevos compuestos se ha ralentizado llegando a ser prácticamente nulo el número de nuevas moléculas en fase de uso terapéutico. Paralelamente al desarrollo de estos antibióticos, las bacterias han ido evolucionando y adquiriendo resistencias a la mayoría de estos compuestos gracias a su elevada plasticidad genética. De hecho, el alarmante incremento de la resistencia bacteriana y la aparición de cepas multirresistentes (cepas resistentes a dos o más familias de antibióticos) es uno de los mayores problemas actuales de salud pública y el tratamiento de estas se ha convertido en un reto para la medicina actual. Este hecho ha sido reconocido por todas las organizaciones nacionales e internacionales de salud, convirtiéndose la lucha contra la resistencia bacteriana a los antibióticos en una prioridad a nivel mundial.

Las unidades de cuidados intensivos (UCI) y las unidades de reanimación de los hospitales albergan pacientes críticamente enfermos que son extremadamente vulnerables a las infecciones. Estas unidades, y sus pacientes, proporcionan un nicho para los microorganismos oportunistas, que generalmente son inofensivos para las personas sanas, pero que, a menudo, son altamente resistentes a los antibióticos y pueden propagarse de forma epidémica entre los pacientes. Las infecciones por tales organismos son difíciles de tratar y pueden conducir a un aumento de la morbilidad y la mortalidad. Además, su erradicación del entorno hospitalario puede requerir medidas

# Introducción

---

específicas, como el aislamiento de los pacientes y el cierre temporal o incluso la reconstrucción de las salas (1).

## 1. El género *Acinetobacter* spp.

### 1.1. Características taxonómicas

La historia del género *Acinetobacter* se remonta al año 1911, cuando Beijerinck, un microbiólogo danés, describió por primera vez un microorganismo que denominó *Micrococcus calcoaceticus* aislado a partir de una muestra de tierra y cultivado en un medio mínimo que contenía calcio-acetato (2). En las siguientes décadas se descubrieron organismos similares asignados a, al menos, 15 géneros y especies diferentes, incluyendo *Diplococcus mucosus*, *Micrococcus calcoaceticus*, *Alcaligenes haemolysans*, *Mima polymorpha*, *Moraxella lwoffii*, *Herellea vaginicola*, *Bacterium anitratum*, *Moraxella lwoffii* var. *glucidolytica*, *Neisseria winogradskyi*, *Achromobacter anitratum*, y *Achromobacter mucosus* (3).

La designación actual del género *Acinetobacter* fue inicialmente propuesta en 1954 por Brisou y Prevot con el fin de separar los organismos móviles de los inmóviles (4) pero no fue hasta 1968 cuando esta designación fue ampliamente aceptada. Baumann y colaboradores (5) publicaron un extenso estudio en el que concluyen que todos los microorganismos similares descritos anteriormente pertenecían a un único género, para el cual se propuso el nombre de *Acinetobacter*. También concluyen que no es posible clasificar estos organismos en diferentes especies basándose en características fenotípicas (3, 5). Estos hallazgos tuvieron como resultado el reconocimiento oficial del género *Acinetobacter* por el “Subcomité sobre la taxonomía de *Moraxella* y bacterias relacionadas” en 1971 (6-8).

En 1991 se propuso clasificar a los miembros del género *Acinetobacter* en la familia *Moraxellaceae*, dentro del orden *Gammaproteobacteria*, el cual incluye géneros como *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Psychrobacter* y organismos relacionados (3, 9).

La hibridación ADN-ADN es de los pocos métodos que han sido validados para la identificación de especies de *Acinetobacter* y, a día de hoy, sigue siendo el método de referencia (10). En 1986, Bouvet and Grimont propusieron veinte grupos genómicos diferentes o genoespecies basándose en esta técnica de hibridación ADN-ADN. En la actualidad se han definido 72 especies dentro del género *Acinetobacter* de las cuales 57 están validadas (<http://apps.szu.cz/anemec/Classification.pdf>, último acceso enero del 2018).

Dentro del género *Acinetobacter*, seis de estas especies (*A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. pittii* [antiguamente nombrada como *Acinetobacter* especie genómica 3], *A. nosocomialis* [antiguamente nombrada como *Acinetobacter* especie genómica 13 TU], *A. seifertii* y *A. dijkschoorniae*) están muy relacionadas y son muy difíciles de distinguir desde un punto de vista fenotípico, por esa razón se incluyeron dentro del llamado complejo *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* (ACB) (11-15). Dentro de este complejo, *A. baumannii* es la especie de *Acinetobacter* con mayor relevancia clínica ya que es el microorganismo responsable de la mayoría de las infecciones nosocomiales causadas por este género bacteriano (3, 16, 17). En los últimos años, *A. pittii* y *A. nosocomialis* han ido adquiriendo gran importancia clínica debido al aumento de los casos de infecciones y brotes hospitalarios que han causado a lo largo del todo el mundo (1, 18-22). *A. calcoaceticus* es una especie típicamente ambiental y hasta hace unos años se desconocían casos de infecciones nosocomiales importantes causadas por este microorganismo (1, 3). Sin embargo, en los últimos años han ido apareciendo casos de neumonías y bacteriemias provocadas por *A. calcoaceticus* (23, 24).

## 1.2. Identificación de especies

*Acinetobacter* se puede identificar a nivel de género como un cocobacilo Gram-negativo, aerobio estricto, catalasa positivo, oxidasa negativo, no móvil y no fermentador. Las especies de *Acinetobacter* de origen humano crecen fácilmente en medios sólidos utilizados de rutina en el laboratorio a una temperatura de incubación de

# Introducción

---

37°C. Las colonias formadas por estos microorganismos son colonias blancas o grisáceas y con un aspecto liso o mucoso. El complejo ACB, muy importante en clínica, forma colonias de 1,5 a 3 mm después de una incubación durante la noche mientras que otras especies de *Acinetobacter* forman colonias más pequeñas y traslúcidas.

Está demostrado que cada especie del género *Acinetobacter* está asociada a mecanismos de resistencia específicos por lo que la identificación a nivel de especie es muy importante a la hora de elegir un tratamiento adecuado (25).

Bouvet y Grimont propusieron en 1986 (10) un sistema de identificación de especies de *Acinetobacter* basado en 28 test fenotípicos que posteriormente fue actualizado por los mismos autores incluyendo pruebas de crecimiento a diferentes temperaturas, producción de ácidos a partir de glucosa o asimilación de 14 diferentes de carbono diferentes entre otras pruebas (26). Este sistema permitía diferenciar la mayoría de las especies descritas hasta la fecha pero, sin embargo, no sirve para identificar especies descritas más recientemente. En particular, las especies que forman el complejo ACB no pueden ser diferenciadas utilizando esta metodología.

Debido a que, tanto la técnica de hibridación ADN-ADN como el método de identificación fenotípico de Bouvet y Grimont, son muy laboriosas, no es posible introducirlas dentro de la rutina de los laboratorios de microbiología clínica. Únicamente algunos laboratorios de referencia realizan estas técnicas a día de hoy (3).

A nivel molecular se han desarrollado y validado una serie de técnicas para la identificación de especies de *Acinetobacter*. Dentro de estas técnicas se incluyen el ribotipado (11), el análisis de restricción del ADN ribosómico amplificado (ARDRA) (27), la detección de polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP) (28), la determinación de la huella del ARNt espaciador (29), el análisis de las secuencias intergénicas 16S-23S ARNr (30), el análisis de secuencias de la región espaciadora del gen 16S-23S (31) o la secuenciación del gen *rpoB* (*RNA polymerase  $\beta$ -subunit*) (32). Todos estos métodos han contribuido a una mejor comprensión de la epidemiología y significado clínico de las especies de *Acinetobacter*. Sin embargo, son demasiado

laboriosos para poder emplearse en laboratorios de microbiología clínica, por lo que su uso se limita principalmente a laboratorios de referencia (3).

Otras técnicas de identificación genotípica más modernas, son la secuenciación masiva, la técnica PCR-ESI-MS (PCR ligada a espectrometría de masas tipo ionización por electrospray) (33), o la PCR del gen *gyrB* (34). Además, técnicas proteómicas, como el MALDI-TOF MS (Desorción/ionización mediante láser asistida por matriz – tiempo de vuelo [MALDI-TOF] espectrometría de masas [MS]) (35, 36) identifican especies en menos de una hora pero requieren un equipamiento muy costoso (3, 37).

La identificación de especies mediante sistemas de identificación comerciales manuales y semiautomatizados que se utilizan actualmente en microbiología diagnóstica, como los sistemas API 20NE, Vitek 2, Phoenix y MicroScan WalkAway, sigue siendo problemática (38). Esto puede explicarse en parte por su limitado contenido de base de datos y porque los sustratos utilizados para la identificación de especies bacterianas no se han adaptado específicamente para identificar especies del género *Acinetobacter*. En particular, los tres miembros clínicamente relevantes del complejo ACB no pueden identificarse empleando sistemas comerciales actualmente disponibles (3).

### 1.3. Reservorios

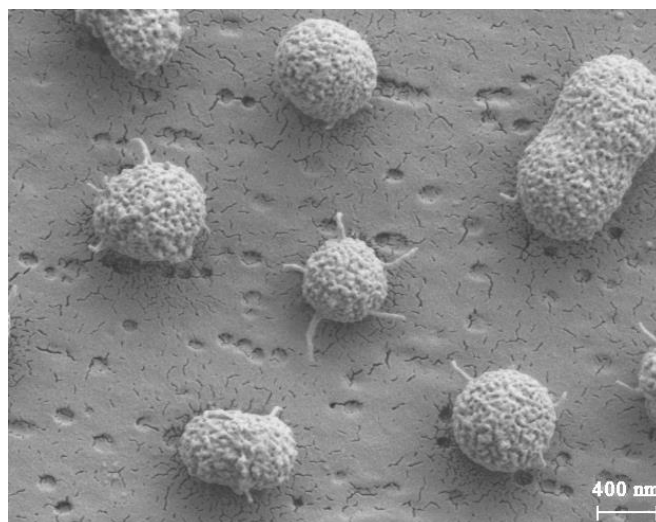
*Acinetobacter* es un género ubicuo por lo que encontramos especies distribuidas en un amplio rango de nichos ecológicos, tales como la piel humana (39), el suelo o el agua (40). Towner (41) propuso la existencia de tres grandes poblaciones de *Acinetobacter*. Una de ellas consiste principalmente en *A. baumannii* y especies del complejo ACB que se localizan en ambientes y equipos hospitalarios, personal sanitario y pacientes hospitalizados y suelen ser resistentes a múltiples antibióticos. La segunda población está representada por especies pertenecientes a la flora normal de animales y humanos y ha aparecido también en comida en mal estado. La tercera población corresponde a aislamientos sensibles a antibióticos obtenidos de fuentes ambientales como suelo o agua. El desarrollo de nuevas técnicas de secuenciación ha permitido

# Introducción

---

estudios metagenómicos que podrían ayudarnos a entender mejor la distribución de estas bacterias (42).

## 2. El patógeno *Acinetobacter baumannii*



**Figura 1.** Micrografía realizada mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) de *A. baumannii* MAR002. Imagen tomada a 50.000 aumentos.

*A. baumannii* es un cocobacilo Gram-negativo aerobio estricto, no fermentador de glucosa, catalasa positivo, oxidasa negativo y no flagelado, que forma parte de la microbiota normal de la piel, tracto gastrointestinal y del aparato respiratorio superior (Figura 1).

*A. baumannii* fue considerado un patógeno de baja importancia hasta que empezaron a aparecer brotes nosocomiales producidos por cepas multirresistentes en diferentes partes del mundo (3). Por esta razón, *A. baumannii* se ha convertido en el miembro más destacado desde el punto de vista clínico del género *Acinetobacter*. Debido al elevado número de infecciones producidas entre veteranos y soldados que sirvieron en los conflictos de Iraq y Afganistán (43), *A. baumannii* se empezó a conocer como Iraqibacter. El éxito de esta especie para producir infecciones hospitalarias se debe a su notable capacidad para sobrevivir y propagarse en el ambiente hospitalario y para



adquirir rápidamente factores de resistencia a una amplia gama de agentes antimicrobianos (16, 41, 44-47). La Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (IDSA) introdujo al patógeno *A. baumannii* en la lista de los microorganismos más peligrosos que se encuentran en los hospitales de todo el mundo (48, 49). Posteriormente, se creó el término ESKAPE, que se utilizó para designar a un grupo de bacterias causantes de la mayoría de las infecciones nosocomiales en Estados Unidos con capacidad para escapar a los efectos de los antibióticos (50, 51) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Listado de los microorganismos que pertenecen al grupo ESKAPE

---

<i>Enterococcus faecium</i> resistente a vancomicina
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (MRSA),
<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Enterobacter</i> especies

---

En febrero del 2017, la OMS publicó una lista en la que clasificó a los patógenos resistentes a antibióticos en tres categorías diferentes para ayudar a priorizar la investigación y desarrollo de tratamientos antibióticos nuevos y efectivos. *A. baumannii* resistente a antibióticos carbapenémicos fue introducido en esta lista dentro de la categoría de prioridad crítica (máxima prioridad) junto con *Pseudomonas aeruginosa* resistente a antibióticos carbapenémicos y Enterobacterias resistentes a carbapenémicos y cefalosporinas de 3ª generación (52).

## **2.1. Importancia clínica del patógeno *A. baumannii***

Las infecciones y brotes hospitalarios producidos por *A. baumannii* han ido aumentando considerablemente en los últimos años y cada vez se aíslan más cepas resistentes a una amplia variedad de antibióticos.

# Introducción

---

La clave del éxito de *A. baumannii* para producir infecciones y brotes nosocomiales se debe a su extraordinaria capacidad para adquirir y desarrollar factores de resistencia a los antimicrobianos y a su capacidad para adaptarse a condiciones ambientales desfavorables (53).

La epidemiología de esta bacteria es bien conocida: el paciente colonizado/infectado es el reservorio principal, las manos del personal sanitario son el mecanismo de transmisión más importante, y el entorno inanimado actúa como reservorio intermedio. El paso de la colonización a la infección se produce cuando *A. baumannii* aprovecha los procedimientos invasivos habituales para ocasionar la infección (53). Los factores de riesgo que predisponen al paciente a adquirir una infección/colonización por *A. baumannii* no son diferentes a los de otros microorganismos multirresistentes. Estos incluyen:

- Factores del propio paciente: cirugía mayor, una herida traumática (en especial una quemadura), una enfermedad grave subyacente o bebés prematuros.
- Factores relacionados con la exposición: una estancia hospitalaria larga, una estancia en la UCI, una estancia en una unidad donde *A. baumannii* es endémica o la exposición a equipo médico contaminado.
- Factores relacionados con el tratamiento médico: ventilación mecánica, presencia de dispositivos invasivos (catéteres o tubos de drenaje), el número de procedimientos invasivos realizados y la terapia previa antimicrobiana (1).

La manifestación clínica más común de la infección por *A. baumannii* es la neumonía adquirida en el hospital y está asociada a pacientes con ventilación mecánica ingresados en la UCI. Se piensa que esta neumonía es el resultado de una colonización de las vías aéreas seguida del desarrollo de la neumonía y tiene una tasa de mortalidad entre el 40 y el 70% (1, 54).

La neumonía adquirida en la comunidad debida a *A. baumannii* se ha descrito en regiones tropicales de Australia y Asia. Esta suele estar relacionada con problemas previos del paciente como el alcoholismo, tabaquismo, enfermedad pulmonar crónica y

diabetes mellitus y tiene una alta mortalidad que oscila entre el 40 y el 64% no pudiéndose aclarar si las causas de esta infección grave son los propios factores del huésped o los factores de virulencia específicos de la bacteria (1).

La bacteriemia es otra de las manifestaciones clínicas más frecuentes de la infección nosocomial por *A. baumannii*. El origen suele ser infecciones del tracto respiratorio inferior o de dispositivos intravasculares, aunque también pueden ser heridas e infecciones del tracto urinario. Los factores de riesgo asociados a la adquisición de bacteriemias son la inmunosupresión, el uso de ventilación asociada a fallo respiratorio, la terapia antibiótica previa, la colonización por *A. baumannii* y los procedimientos invasivos. Las tasas de mortalidad de bacteriemias producidas por *A. baumannii* se encuentran entre un 28% y un 43% (55).

*A. baumannii* ha emergido como el principal agente causal de infecciones en quemaduras en personal militar donde el 53% de los aislamientos son multirresistentes. Estas infecciones son muy complicadas de tratar debido a las elevadas tasas de resistencias y a la baja penetración de los antibióticos en las zonas quemadas. A pesar de las posibles complicaciones que pueden resultar de la infección de una quemadura por *A. baumannii* no está clara la tasa de mortalidad atribuible al patógeno (56).

La infección de tejidos blandos y de piel por *A. baumannii* en personal militar ha producido casos de celulitis o fascitis necrotizante. Dentro de esta población también se han descrito casos aislamientos de osteomielitis (56). Se ha descrito un incremento en los casos de meningitis producidas por *A. baumannii* principalmente en pacientes que se recuperan de neurocirugías (57, 58). Es difícil estimar la tasa de mortalidad asociada ya que el número de estudios es limitado (56).

### **3. Mecanismos de resistencia de *A. baumannii***

Incluso la bacteria más resistente puede ser erradicada o inhibida con una concentración suficientemente alta de antibiótico, el problema es que, casi siempre, las

# Introducción

---

dosis muy elevadas serían tóxicas para el paciente. Por esa razón se incluyó el término de resistencia clínica, en el cual interactúan el tipo de bacteria infectante y su localización en el cuerpo, la distribución del antibiótico en el cuerpo y su concentración en el foco de la infección así como el estado inmunológico del paciente. De esta forma se diría que una bacteria es resistente cuando no se puede matar con una concentración terapéutica de antibiótico (59).

La resistencia que los microorganismos tienen a los agentes antimicrobianos puede ser intrínseca o adquirida. La resistencia intrínseca es aquella que ocurre de forma natural debido a la biología del microorganismo y se debe principalmente a la impermeabilidad celular y a la actividad de bombas de expulsión. La resistencia adquirida ocurre cuando las bacterias desarrollan resistencia a un antimicrobiano a través de mutaciones o captando ADN exógeno. Las mutaciones pueden ser transferidas de unos microorganismos a otros a través de secuencias de inserción y transposones presentes en plásmidos (59).

*A. baumannii* se ha convertido en los últimos años en uno de los patógenos más exitosos de la medicina moderna en parte debido a su extraordinaria capacidad de adquirir mecanismos de resistencia. Cada vez se aíslan más cepas de *A. baumannii* resistentes a la mayoría de los antibióticos disponibles en la clínica (60). La acumulación de diferentes mecanismos de resistencia en cepas de *A. baumannii* está provocando que el número de posibles tratamientos frente a estas infecciones se haya reducido notablemente. Son especialmente alarmantes los casos de infecciones causadas por cepas pan-resistentes con resistencias a todos antibióticos usados en la clínica (61).

Hay una serie de factores que pueden favorecer a que *A. baumannii* adquiera la multirresistencia (62):

- La capacidad de sobrevivir en reservorios ambientales y humanos lo que puede favorecer la transferencia de material genético entre microorganismos.
- La capacidad de adquisición de elementos genéticos como plásmidos, integrones o transposones.

- La resistencia intrínseca de estos microorganismos que puede ser explicada por su baja permeabilidad a ciertos antibióticos a través de la membrana o la expresión de bombas de expulsión.

Los avances en las técnicas de secuenciación y análisis bioinformáticos permitieron una mejora en los análisis de genómica comparativa de cepas clínicas y revelaron la extraordinaria capacidad de *A. baumannii* para adquirir material genético (56).

Estos análisis genómicos se centraron principalmente en las grandes islas de resistencia a los antibióticos (AbaR1, R2, R3 y R5). El primer estudio de este tipo que se realizó fue con la cepa *A. baumannii* AYE (63). En dicho estudio se observó que su fenotipo multirresistente se debía a la adquisición de la isla de resistencia AbaR1 de 86-Kb que contenía 45 genes de resistencia a diferentes clases de antibióticos. Estudios posteriores con la cepa ACICU revelaron que *A. baumannii* tiene la capacidad de adaptarse al ambiente hospitalario no sólo mediante la adquisición horizontal de elementos genéticos responsables de la evolución a cepas multirresistentes, sino también mediante la reorganización de genes preexistentes (64).

La resistencia de *A. baumannii* a los antibióticos esta mediada por los principales mecanismos de resistencia que se conocen en las bacterias, entre los que se encuentran la modificación de las dianas del antibiótico, la inactivación enzimática, las bombas de expulsión o el descenso de la permeabilidad de la membrana (56, 65) (Tabla 2).

La rápida aparición de cepas de *A. baumannii* resistentes a todos los betalactámicos, incluyendo carbapenemas (betalactámicos de amplio espectro), muestra la capacidad de este organismo para responder con rapidez a los cambios en la presión selectiva del medio (3). Aunque en los primeros estudios los aislamientos clínicos de *A. baumannii* resultaron ser sensibles a estos antibióticos carbapenémicos, a partir de los años 90 ya empezaron a aparecer brotes hospitalarios provocados por cepas resistentes (66).

# Introducción

**Tabla 2.** Principales mecanismos de resistencia de *A. baumannii*. Tabla modificada de la referencia (56).

Antibiótico	Mecanismo de resistencia	Ejemplos
β-lactámicos	Inactivación por enzimas	β-lactamasas (AmpC, TEM, VEB, PER, CTX-M, SHV) Carbapenemasas (OXA-23-like, OXA-24/40-like, OXA-51-like, OXA-58-like, OXA-143-like, VIM, IMP, NDM-1, NDM-2)
	Disminución de la expresión de porinas	CarO, Omp 33-36, OprD-like
	Alteración de la expresión de las PBPs	PBP2
	Bombas de expulsión	AdeABC
Fluoroquinolonas	Modificación de la diana	Mutaciones en <i>gyrA</i> y <i>parC</i>
	Bombas de expulsión	AdeABC, AdeM
Aminoglucósidos	AMEs	AAC, ANT, APH
	Bombas de expulsión	AdeABC, AdeM
	Metilación ribosomal	ArmA
Tetraciclinas	Bombas de expulsión	AdeABC, TetA, TetB
	Protección ribosomal	TetM
Polimixina E (Colistina)	Modificación del lípido A	PmrCAB
	Pérdida del LPS	LpxABC
	Perdida de porinas	OmpW

## 4. Patogénesis y factores de virulencia en *A. baumannii*

La patogenicidad es la capacidad de un microorganismo para causar enfermedad. La mayoría de los agentes patógenos hacen uso de una combinación de dos propiedades para causar la enfermedad: (i) toxicidad, grado en que una sustancia causa daño, y (ii)

invasividad, capacidad de penetrar en el huésped y de propagación. El resultado final dependerá de la virulencia o patogenicidad del microorganismo, así como de la susceptibilidad del huésped a la infección. Las bacterias y sus huéspedes han coevolucionado durante millones de años, a través de los cuales las bacterias patógenas han modificado su virulencia para poder adaptarse a los sistemas de defensa del huésped (67).

## 4.1. Factores de virulencia

Debido a la urgente necesidad de entender los mecanismos de patogenicidad de *A. baumannii* se han publicado una serie de estudios que podrían ayudar al desarrollo de nuevas terapias dirigidas. Méndez y colaboradores (68) caracterizaron el proteoma de la cepa multirresistente *A. baumannii* AbH12O-A2 en condiciones que simulaban las vías respiratorias con la finalidad de obtener información de cómo se adapta al huésped y aumentar el conocimiento sobre su patogénesis y virulencia. En otro estudio reciente se obtuvo el transcriptoma completo de células de *A. baumannii* ATCC 17978 aisladas durante una bacteriemia en un modelo murino el cual originó información sobre los genes involucrados en ese tipo de infección (69).

A pesar de que en los últimos años se han identificado un gran número de factores de virulencia responsables de la patogenicidad de este microorganismo, la información todavía es escasa si se compara con los datos descritos en otros patógenos Gram-negativos (56) (Tabla 3).

**Tabla 3.** Principales factores de virulencia descritos en *A. baumannii*. Tabla modificada a partir de las referencias (56, 70).

Factor de virulencia	Papel en la patogénesis
Proteínas de membrana externa (OmpA, Omp33-36, Omp22)	Adherencia e invasividad, inducción de la apoptosis, formación de <i>biofilm</i> , persistencia y resistencia al suero

# Introducción

---

Lipopolisacárido	Resistencia al suero, supervivencia durante la infección de tejidos, evasión de la respuesta del sistema inmune
Polisacárido capsular	Resistencia al suero, supervivencia durante la infección de tejidos, formación de <i>biofilm</i>
Fosfolipasas (PLC y PLD)	Resistencia al suero, actividad citolítica, invasión, supervivencia <i>in vivo</i>
Vesículas de membrana externa	Liberación de factores de virulencia, transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos
Proteína de unión a la penicilina (PBP7/8)	Resistencia al suero, supervivencia <i>in vivo</i>
Sistema de secreción tipo II	Supervivencia <i>in vivo</i>
Sistema de secreción tipo VI	Colonización del huésped, competición bacteriana
Sistema de secreción tipo V	Formación de <i>biofilm</i> , adherencia y supervivencia <i>in vivo</i>

## 4.1.1. Proteínas de membrana externa

Las proteínas de membrana externa (OMPs) de bacterias Gram-negativas se han relacionado con resistencia a antibióticos y adaptabilidad y patogenicidad en las células del huésped.

La proteína de membrana externa OmpA es el factor de virulencia mejor caracterizado de *A. baumannii*. Se ha visto que una cepa de *A. baumannii* deficitaria de OmpA era incapaz de inducir la apoptosis en células epiteliales humanas laríngeas (Hep-2) al mismo nivel que la cepa salvaje. Se comprobó que la proteína purificada entraba en las células humanas y se localizaba en las mitocondrias ocasionando la liberación de moléculas proapoptóticas (71). OmpA también contribuye a la habilidad de *A. baumannii* de persistir y crecer en el suero humano ya que interactúa con los inhibidores solubles de la vía alternativa del complemento y permite que las bacterias eviten la muerte mediada por el complemento (72). Se vio que OmpA regula la formación de vesículas de



membrana externa (73) y que forma parte de ellas pudiendo alcanzar de esta forma la célula huésped induciendo su apoptosis (74).

La proteína Omp33-36, la cual actúa como un canal de acuaporina, es otra proteína de membrana externa que se ha asociado con la virulencia de *A. baumannii*. La supresión del gen *omp33-36* atenuó la letalidad y redujo la carga bacteriana en hígado y pulmones en un modelo de sepsis murino (75). Además, Rumbo y colaboradores (76) demostraron que esta proteína era capaz de inducir apoptosis en diferentes líneas celulares.

#### 4.1.2. Lipopolisacárido y polisacárido capsular

El lipopolisacárido (LPS) es el componente mayoritario de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas y es considerado un factor de virulencia muy importante en *A. baumannii*. Está formado por el lípido A o endotoxina, el núcleo carbohidrato (core) y una región variable llamada antígeno O (77). En *A. baumannii*, el LPS está involucrado en virulencia y en la supervivencia bacteriana (78-80). Se ha visto que los mutantes carentes de LpsB, enzima implicada en la biosíntesis del LPS, presentan una disminución de la resistencia al suero y descenso en la supervivencia en modelos animales (81). El tratamiento de ratones con un inhibidor de LpxC condujo a la protección frente a la infección (82). Mutaciones en los genes *lpxA*, *lpxC* o *lpxD*, asociadas a la resistencia a colistina, resultaron en la completa pérdida del LPS. Beceiro y colaboradores (83) demostraron que estas mutaciones afectaban negativamente a la eficacia biológica y a la virulencia de *A. baumannii* ATCC 19606.

Cepas mutantes carentes de cápsula presentaron una reducción en el crecimiento en suero humano y líquido ascítico y una reducción en la supervivencia en modelos animales (84, 85). Geisinger y colaboradores (86) estudiaron el locus K, responsable de la producción de polisacáridos de superficie, y su implicación en la resistencia de *A. baumannii* a los antibióticos. Los autores encontraron que los polisacáridos del locus K ayudaban a la resistencia a múltiples antibióticos e, inesperadamente, que la bacteria respondía a ciertos antibióticos en concentraciones subinhibitorias aumentando la

# Introducción

---

producción de la cápsula. La producción aumentada de la cápsula, polisacárido principal del locus K, aumentó la capacidad de la bacteria para superar el ataque del complemento y aumentó la virulencia de la bacteria durante un modelo de infección sistémica.

### 4.1.3. Fosfolipasas

Las fosfolipasas son enzimas lipolíticas esenciales en el metabolismo de los fosfolípidos. Se cree que contribuyen a la virulencia de bacterias Gram-negativas ayudando en la lisis de las células huésped. Esto ocurre mediante la escisión de fosfolípidos presentes en la membrana de las células huésped y la posterior degradación de los fosfolípidos de las barreras mucosas, lo cual permite la invasión.

La inactivación de un gen que codifica la fosfolipasa C condujo a una ligera reducción de la citotoxicidad de *A. baumannii* en células epiteliales (87). En otro estudio se demostró que la interrupción de los genes que codifican las fosfolipasas C (*plc1* y *plc2*) de la cepa ATCC 19606 provocaba un descenso en la actividad hemolítica y citolítica de la bacteria y que la interrupción del gen *plc1* reducía la virulencia en un modelo invertebrado (88).

La disrupción de uno de los dos genes que codifican las fosfolipasas D presentes en el genoma de la cepa 98-37-09 de *A. baumannii* provocó la reducción en la resistencia de la bacteria al suero humano, el descenso en la capacidad de invasión de tejidos epiteliales y el descenso en la virulencia en un modelo murino de neumonía (89). Además, Stahl y colaboradores (90) demostraron en modelos de infección en *Galleria mellonella* y de invasión en células A549 que las tres fosfolipasas D presentes en la cepa ATCC 19606 actúan de forma conjunta como factores de virulencia.

### 4.1.4. Vesículas de membrana externa

Las vesículas de membrana externa (OMVs) son vesículas secretadas a partir de la membrana externa de bacterias Gram-negativas y están formadas por proteínas de membrana externa y periplasma, fosfolípidos y LPS. Estas vesículas podrían contribuir a la infección al permitir la administración de cargas bacterianas tóxicas a las células

huésped, a menudo mediante la internalización de todo el contenido de la vesícula (91). Méndez y colaboradores (92), mediante el estudio proteómico del secretoma de una cepa de *A. baumannii*, identificaron 39 proteínas relacionadas con patogénesis y virulencia tales como OmpA, hemolisinas o proteasas. Estudios con OMVs de ATCC 19606 purificadas demostraron que estas eran capaces de inducir la respuesta inflamatoria en células epiteliales (93) y, de hecho, varios estudios las propusieron como vacunas (94).

#### 4.1.5. Proteínas de unión a la penicilina

Las proteínas de unión a la penicilina (PBPs), enzimas asociadas a la unión e inactivación de antibióticos  $\beta$ -lactámicos, participan en los últimos pasos de la síntesis del peptidoglicano y, por lo tanto, contribuyen a la estabilidad de la bacteria. Cepas mutantes en el gen *pbpG*, que codifica la PBP7/8, presentaron una reducción en la resistencia al suero y en la virulencia en modelos animales. Análisis a través de microscopía electrónica sugirieron que la pérdida de la PBP7/8 podía afectar a la estructura del peptidoglicano y, por lo tanto, a la susceptibilidad de la bacteria a las defensas del huésped (95).

#### 4.1.6. Sistemas de secreción

Se han identificado varios sistemas de secreción de proteínas en *A. baumannii*.

El sistema de secreción tipo II (T2SS) es un sistema multiproteico ampliamente distribuido entre las bacterias Gram-negativas. Está formado por entre 12 y 15 proteínas que actúan de forma conjunta y se encarga de secretar al exterior de la bacteria una gran cantidad de factores de virulencia (96). La delección de los genes *gspD* y *gspE* en *A. baumannii* ATCC 17978 dio como resultado la pérdida de secreción de la lipasa LipA. Cepas mutantes de cada uno de estos genes *gspD*, *gspE* y *lipA* fueron incapaces de crecer durante un modelo murino neutropénico de bacteriemia (97).

El sistema de secreción tipo VI (T6SS) corresponde a un mecanismo de interacción célula-célula ampliamente distribuido en bacterias Gram-negativas. En *A. baumannii* se ha visto que la implicación del sistema T6SS en virulencia es específico de cada cepa y

# Introducción

---

está involucrado en la colonización del huésped y en la competencia bacteriana ya que ayuda a matar a las bacterias competidoras (98).

El sistema de secreción tipo V (T5SS) está constituido por el autotransportador Ata. Este está formado por una proteína de membrana trimérica y se ha visto que está involucrado en la virulencia de *A. baumannii* usando un modelo de infección sistémica en ratón (99).

## 4.2. Movilidad bacteriana

La habilidad que tienen algunas bacterias para moverse les proporciona ventajas en la colonización del hospedador, en la defensa contra competidores y en la adaptabilidad a los cambios del entorno. Históricamente, el género *Acinetobacter* se ha descrito como no móvil debido a la ausencia de flagelo (5).

A pesar de esto, *A. baumannii* se mueve rápidamente sobre superficies probablemente debido a un movimiento tipo *twitching*, una forma de movimiento en superficie descrito por primera vez en *A. calcoaceticus* (100).

Los pili tipo IV son apéndices bacterianos multiprotéicos presentes en muchas bacterias Gram-negativas. Debido a su naturaleza dinámica, estos pili son capaces de ensamblarse y desensamblarse rápidamente participando en procesos como la transformación, movilidad tipo *twitching* y la adherencia a superficies bióticas y abióticas.

La movilidad tipo *twitching* consiste en el ensamblaje, fijación y posterior retracción del pilus ayudando así al movimiento de la célula hasta el punto de fijación del pilus (101). Análisis bioinformáticos de genomas completos de *A. baumannii* han revelado la presencia de genes relacionados con los pili tipo IV incluyendo genes involucrados en el ensamblaje (*pilA*, *pilB*, *pilC*, *pilF*, *pilM*, *pilN*, *pilO*, *pilP*, *pilQ*, *pilZ*, *pilW*), en el movimiento tipo *twitching* (*pilR*, *pilS*, *pilT*, *pilU*) y en la subunidad del pilus (*pilA*)

(47). Se ha correlacionado positivamente el grado de conservación de la secuencia del gen que codifica la subunidad PiliA de cada cepa con el movimiento tipo *twitching* que presentan (102). La cepa *Acinetobacter nosocomialis* M2 es una cepa transformante natural y presenta movimiento tipo *twitching*. Los mutantes isogénicos de la cepa *A. nosocomialis* M2 en los genes *pilA*, *pilD* y *pilT* perdieron las habilidades de movimiento y de ser transformantes naturales (101). Además, se observó que la movilidad en superficie que tienen algunos aislamientos clínicos es independiente de la producción de los pili tipo IV (101). En otro trabajo, Clemmer y colaboradores (103) demostraron que la movilidad de *A. nosocomialis* era en parte dependiente del gen *pilT*. La pérdida de este gen en la cepa de *A. nosocomialis* M2 resultó en una bajada del 52% de la movilidad. Sin embargo, este mutante todavía era móvil en superficie lo que sugiere que esta cepa tiene un tipo de movilidad independiente de los pili tipo IV. Además, se identificaron otros genes necesarios para la movilidad de la cepa M2, entre los que destacan un gen implicado en la síntesis de un lipopéptido, el gen que codifica la quinasa BfmS, un gen implicado en la biosíntesis del antígeno O y un gen que codifica la porina OmpA (103).

La densidad bacteriana es otro factor que regula la movilidad de una cepa bacteriana. El *quorum sensing* es un mecanismo que regula la expresión de genes en función de la densidad celular. Este sistema se basa en la producción, detección y respuesta a unas moléculas señalizadoras llamadas autoinductores (104). En *A. baumannii*, las moléculas descritas de este tipo son las N-acil homoserín lactonas (AHL) (47). La adición de N-acil homoserín lactona no nativa aumentó la capacidad de movimiento tipo *twitching* de *A. baumannii* ATCC 19606 (105). La inactivación de *abaI*, gen que codifica una enzima encargada de la síntesis de una N-acil homoserín lactona, provocó la reducción drástica en la capacidad de movimiento de la cepa M2. Esta movilidad se restauró tras añadirle de forma exógena la N-acil homoserín lactona (103).

Se observó que las células únicamente presentaban movilidad cuando se incubaban en oscuridad (106). Siguiendo la hipótesis de que *A. baumannii* responde a estímulos externos, McQueary y colaboradores (107) realizaron un estudio con aislamientos clínicos que poseían movilidad en superficie. Se vio que algunos factores extracelulares de estrés reducían la movilidad de estas cepas mientras que en

# Introducción

---

condiciones de menos estrés, como la reducción de la salinidad o la presencia de hierro extracelular, la aumentaban.

## 4.3. Adherencia y formación de *biofilm*

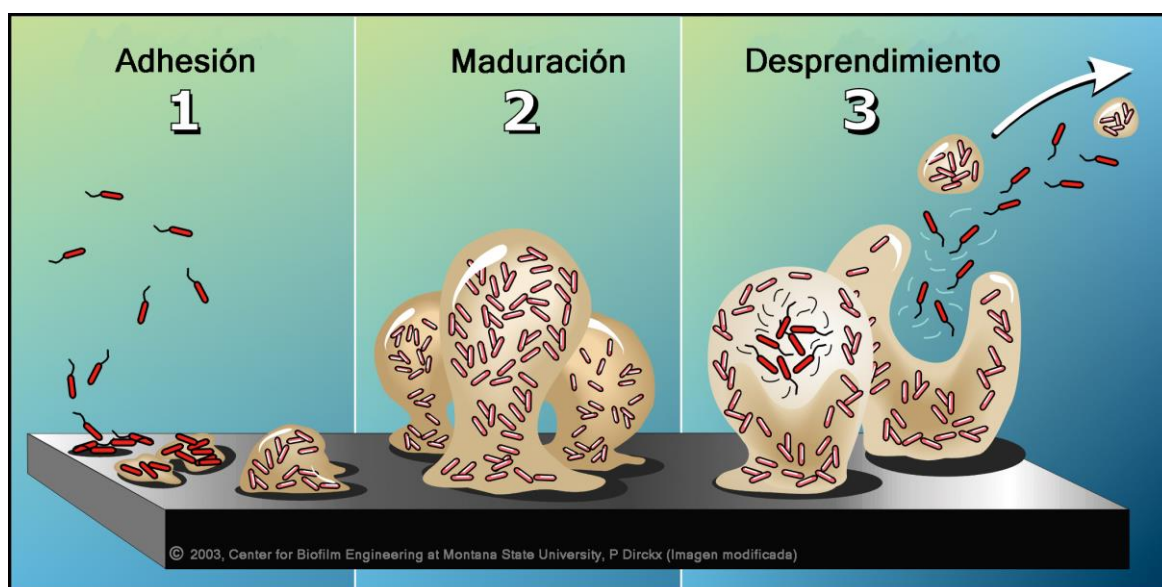
*A. baumannii* tiene una extraordinaria capacidad para sobrevivir y prosperar en ambientes hospitalarios debido, principalmente, a su habilidad para interactuar con diferentes tipos de superficies bióticas y abióticas (56, 108). *A. baumannii* coloniza dispositivos permanentes, tales como catéteres y equipos respiratorios, así como superficies bióticas, tales como células epiteliales humanas o filamentos de *Candida albicans* (109, 110).

Generalmente, la adherencia a estas superficies representa el paso inicial en la colonización e infección. Durante este proceso de colonización, las bacterias forman microcolonias que originan comunidades microbianas muy bien estructuradas que se conocen como *biofilms* o biopelículas (111).

El *biofilm* es una compleja asociación tridimensional de células bacterianas en estrecho contacto entre ellas y embebidas en una matriz extracelular producida por ellas mismas. Esta matriz está compuesta por exopolisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y otras macromoléculas y constituye una barrera protectora para la bacteria ya que le permite sobrevivir en ambientes hostiles y durante una infección. Debido a las características estructurales del *biofilm*, las bacterias que forman parte de este, son más resistentes al estrés que sus homólogos planctónicos (47). Por lo tanto, un elevado número de infecciones bacterianas crónicas implican *biofilms* bacterianos que no son fácilmente eliminados usando terapia antibiótica convencional. Las infecciones asociadas a *biofilm* comparten una serie de características clínicas. El *biofilm* se desarrolla preferentemente en superficies inertes o tejido muerto donde el crecimiento y la aparición de síntomas son muy lentos. Las células bacterianas sésiles liberan antígenos y estimulan la producción de anticuerpos, pero las infecciones producidas por *biofilm* raramente son resueltas por los mecanismos de defensa del huésped. La terapia

antibiótica es efectiva frente a células planctónicas pero no es eficaz frente a bacterias que forman el *biofilm*. Por esta razón, las infecciones producidas por *biofilm* normalmente muestran síntomas recurrentes después de varios ciclos de antibióticos (112).

El desarrollo del *biofilm* bacteriano se puede dividir en tres etapas en las que intervienen diferentes factores: adhesión, maduración y desprendimiento del *biofilm* (113, 114) (Figura 2).



**Figura 2.** Representación de las etapas del desarrollo del *biofilm*. Imagen modificada del Centro de Ingeniería del *Biofilm* (*Center for Engineering*) de la Universidad de Montana (<http://www.biofilm.montana.edu>).

La etapa inicial de adhesión puede ocurrir sobre superficies abióticas o bióticas. La adhesión a superficies abióticas, tales dispositivos médicos permanentes, es dependiente de las características fisicoquímicas de la bacteria y de la superficie a la que se va a adherir y suele producirse gracias a interacciones hidrofóbicas o electrostáticas. La adhesión a superficies bióticas, tales como tejidos humanos, suele producirse a través de interacciones más específicas mediada por proteínas de superficie celular. Durante la etapa de maduración se forma un *biofilm* tridimensional y muy bien organizado en la que intervienen factores de adhesión y de proliferación así como procesos disruptivos que

# Introducción

---

forman canales en la estructura. Estos canales son necesarios para que los nutrientes lleguen a las bacterias que se encuentran en las capas más profundas del *biofilm*. En la última fase se produce el desprendimiento durante el cual parte de las células que forman el *biofilm* se sueltan provocando la multiplicación y dispersión de la infección (113).

Algunos aislamientos clínicos de *A. baumannii* son capaces de formar *biofilms* en la superficie de la fase líquida que se conocen como *pellicles* (115, 116) y su formación es muy variable dentro de los diferentes aislamientos de *A. baumannii* (115).

Los factores más comunes que influyen en la formación del *biofilm* son la disponibilidad de nutrientes, la presencia de apéndices bacterianos, los componentes superficiales de la bacteria (tales como adhesinas o proteínas de membrana externa), el *quorum sensing* y la secreción de moléculas al exterior (117, 118). Además, se sabe que existen complejas redes de regulación y reguladores transcripcionales activados por señales ambientales que son responsables de la expresión de genes asociados con la formación de *biofilm* (119).

Se publicaron una serie de trabajos descriptivos a nivel transcriptómico y proteómico para intentar comprender cómo *A. baumannii* se adhiere y forma *biofilm*. Cabral y colaboradores (120) encontraron diferencias en los perfiles proteicos entre células planctónicas y células sésiles. En este trabajo se demostró la implicación en la formación de *biofilm* de las proteínas de superficie celular CarO, OmpA, OprD-like, DcaP-like, PstS, LysM y Omp33, y de las proteínas involucradas en el metabolismo de histidina. Un estudio transcriptómico comparativo entre células planctónicas y células sésiles asociadas al *biofilm* (121) reveló diferentes perfiles de expresión génica en el *biofilm* que dan cuenta de cambios en el metabolismo de aminoácidos y ácidos grasos, la movilidad, el transporte activo, la metilación de ADN, la adquisición de hierro, la regulación transcripcional y el *quorum sensing*. Este estudio reveló que 1621 genes estaban diferencialmente expresados en células de *biofilm* con respecto a células planctónicas y que 55 de ellos estaban expresados solamente en el *biofilm*. La delección del gen A1S\_0114 del genoma de *A. baumannii* ATCC 17978, gen que codifica una proteína



transportadora de grupos acilo, resultó en una reducción significativa de la capacidad de la bacteria de formar *biofilm* (121). Otro estudio (122) describió el conjunto de pequeñas moléculas de ARN (sRNAs) presentes en las células del *biofilm* en comparación con el de las células libres planctónicas. Se identificaron un total de 255 sRNAs de los cuales 185 estaban diferencialmente expresados en los dos tipos celulares. Un total de 9 sRNAs sólo se encontraron expresados en células de *biofilm*, mientras que otros 21 sRNAs estaban completamente reprimidos en las células sésiles del *biofilm*. Entre ellos, el sRNA 13573 resultó estar sobreexpresado 120 veces más en las células que forman parte del *biofilm* que en las células planctónicas libres. El análisis de un mutante isogénico y de la cepa que sobreexpresaba este sRNA reveló que el gen de sRNA 13573 estaba implicado en la formación de *biofilm* y en la unión a células epiteliales alveolares humanas A549 (122).

Debido a que la formación de *biofilm* es un proceso multifactorial, se han descrito una serie de factores que están involucrados en la adherencia y formación de *biofilm* sobre superficies bióticas y abióticas (123). Entre ellos, se encuentran los pili de tipo chaperona-usher, las proteínas de membrana, los polisacáridos de superficie, los sistemas de secreción y el *quorum sensing*.

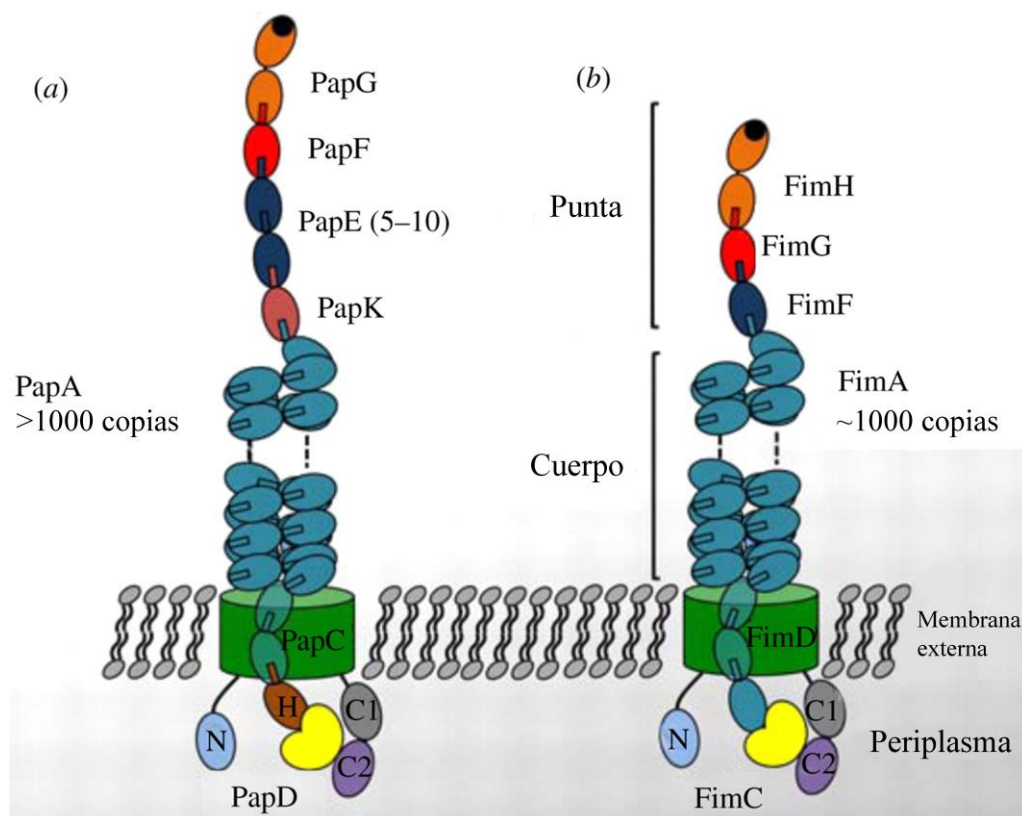
#### **4.3.1 Pili de tipo chaperona-usher**

Los pili de tipo chaperona-usher son apéndices bacterianos localizados de forma ubicua en la superficie de bacterias patógenas. Tienen un papel esencial en la formación de *biofilm* y son particularmente relevantes durante la infección ya que son responsables del reconocimiento y la adhesión de las bacterias al huésped. Los genes que codifican estos sistemas se localizan en muchos casos en forma de operones y están formados como mínimo por un gen que codifica un usher, un gen que codifica una chaperona, y un gen que codifica la subunidad del pilus (124, 125).

Dentro de estos sistemas de formación de pili, dos de los más estudiados son el pilus tipo I y el P pilus, descritos en *Escherichia coli*. Ambos están implicados en las interacciones patógeno-huésped y son importantes en el desarrollo de la infección y en la formación de *biofilm*. Tanto el P pilus como el pilus tipo I están formados por varias

# Introducción

subunidades dispuestas en dos subconjuntos distintos: la punta y el cuerpo del pilus. Las subunidades del pilus son transportadas desde el citoplasma al periplama a través de una vía general de secreción denominada SecYEG. Estas subunidades son incapaces de plegarse y ensamblarse a la superficie celular por si mismas por lo que necesitan dos proteínas accesorias. Estas proteínas son: (i) una chaperona localizada en el periplasma que estabiliza y pliega las subunidades del pilus evitando que estas polimericen en el citoplasma, y (ii) un sistema de ensamblaje en la membrana externa denominado usher (124) (Figura 3).



**Figura 3.** Esquema del (a) P pilus y del (b) pilus tipo I de *Escherichia coli* ensamblados a través de los sistemas de secreción Pap y Fim, respectivamente. Imagen modificada de la referencia (124).

En *A. baumannii* el sistema más estudiado es el CsuA/BABCDE. En 2003, Tomaras y colaboradores (126), demostraron que la habilidad de *A. baumannii* ATCC 19606 de

formar pili era dependiente de la expresión del gen *csuE*. La interrupción de este gen, perteneciente a un sistema de secreción chaperona-usher, resultó en la pérdida de la capacidad de *A. baumannii* ATCC 19606 para adherirse y formar *biofilm* en superficies abióticas. Además, experimentos de microscopía electrónica revelaron que la inactivación de este gen resultaba en la pérdida de la capacidad de formar pili sugiriendo que el sistema chaperona-usher *CsuA/BABCDE* tiene un papel importante en los primeros pasos de la formación del *biofilm*.

La expresión de este operón está controlada por un sistema de regulación de dos componentes que incluyen una quinasa, codificada por el gen *bfmS*, y un regulador de respuesta, codificado por el gen *bfmR*. La inactivación de *bfmR* tuvo como resultado la pérdida de expresión del operón *csu* y por lo tanto la inhibición de la formación de pili y la formación de *biofilm* sobre superficies abióticas. La inactivación de *bfmS* resultó en la disminución de la capacidad de formación de *biofilm* pero no en su inhibición completa (127). Además de estos pili dependientes del sistema *CsuA/BABCDE*, *A. baumannii* ATCC 19606 produce otro tipo de pili más cortos que están involucrados en la adherencia de las bacterias a superficies bióticas como células epiteliales humanas (128).

Un estudio de los *pellicles* producidos por diferentes cepas clínicas mostró que las proteínas más abundantes en la matriz de los *pellicles* eran proteínas pertenecientes a tres sistemas diferentes de formación de pili tipo chaperona-usher: *CsuA/B* (perteneciente al operón *csu*), una proteína codificada por el gen *A1S\_1510* (perteneciente al operón *A1S\_1507-1510*) y una proteína codificada por el gen *A1S\_2091* (perteneciente al operón *A1S\_2088-2091*) (129). Rumbo-Feal y colaboradores (121) demostraron que la disrupción del gen *A1S\_1507* (perteneciente al operón *A1S\_1507-1510*) tenía como resultado la reducción en la capacidad de formar *biofilm* de la cepa ATCC 17978.

### 4.3.2. Proteínas de membrana

*A. baumannii* tiene un homólogo de la proteína Bap (*biofilm-associated protein*) de *Staphylococcus aureus*. La mutación en el gen que codifica esta proteína resultó en la

# Introducción

---

disminución del grosor y volumen del *biofilm* de la cepa *A. baumannii* 307-0294 (130). Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que esta proteína podría estar involucrada en las interacciones célula-célula necesarias para el desarrollo y mantenimiento del *biofilm* maduro. Esta proteína está muy conservada dentro de las cepas clínicas de *A. baumannii* y se ha visto que también tiene un papel importante en la adherencia a células epiteliales bronquiales y a queratinocitos neonatales humanos (131). De Gregorio y colaboradores (132) identificaron dos proteínas adicionales, BLP1 y BLP2, que comparten un motivo en la región N-terminal con la proteína Bap. La delección de los genes que codifican las proteínas BLP1 y BLP2 afectó gravemente a la capacidad de formar *biofilm* y de adherirse a células epiteliales de la cepa *A. baumannii* AYE.

La proteína OmpA de *A. baumannii* ATCC 19606 tiene un papel parcial en el desarrollo del *biofilm* maduro sobre plástico y es esencial para la adherencia a filamentos de *Candida albicans* y a células epiteliales humanas. La interacción entre ATCC 19606 y los filamentos de *C. albicans* es independiente de los pili del sistema de chaperona-usher CsuA/BABCDE lo que sugiere que no hay una correlación directa entre la formación de *biofilm* en superficies bióticas y abióticas (133, 134). Estudios posteriores demostraron que OmpA actúa como una adhesina que interviene en la unión de *A. baumannii* a la fibronectina localizada en la superficie de las células del huésped y es necesaria para la persistencia de la bacteria en el pulmón (135, 136).

Además del papel de la proteína OmpA en la formación de *biofilm* también se estudió el efecto de la delección del gen *omp33* del genoma de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978. Experimentos realizados con la cepa salvaje y su mutante isogénico revelaron una reducción significativa tanto en la capacidad de adherencia como en la de invasión a células epiteliales de pulmón (75).

### 4.3.3. Polisacáridos de superficie

El polisacárido extracelular poly- $\beta$ -(1-6)-N-acetilglucosamina (PNAG) está descrito como el componente mayoritario del *biofilm* de especies como *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus* (137). En aislamientos clínicos de *A. baumannii*, el

locus *pgaABCD*, que codifica las proteínas necesarias para la síntesis del PNAG, es muy importante para el desarrollo del *biofilm*. Al deletar el locus *pgaABCD* se observó que el volumen, grosor medio y grosor máximo del *biofilm* producido por la cepa salvaje fue mayor comparado con la cepa mutante (138). Además, mutaciones en los genes *pglC* y *pglL*, responsables de la síntesis del O-pentasacárido localizado en glicoproteínas y polisacáridos capsulares, condujeron a la aparición de unas estructuras de *biofilm* anormales (139).

#### 4.3.4. Sistemas de secreción

El sistema de secreción tipo V abarca las proteínas autotransportadoras, el sistema de secreción de dos componentes y las recientemente descritas proteínas VC o AT-2. Todos estos mecanismos se dedican a la translocación de grandes proteínas o sus dominios a la superficie bacteriana (140). Una serie de estudios demostraron la implicación de este sistema de secreción en la capacidad de la bacteria de formar *biofilm* y de adherirse a células eucariotas. Betancor y colaboradores (99) describieron el autotransportador Ata (*Acinetobacter trimeric Autotransporter*) de la cepa ATCC 17978. Ata es una proteína trimérica de membrana implicada en la formación de *biofilm* y en la adherencia de la bacteria a componentes extracelulares de la matriz como el colágeno I, III y IV.

Además, se describió en *A. baumannii* ATCC 19606 un sistema de secreción de dos componentes denominado FHA, compuesto por una exoproteína (FhaB) y un transportador (FhaC). La proteína FhaB resultó estar implicada en la adherencia bacteriana y en la formación de *biofilm* (141). Posteriormente, se realizó un estudio con la cepa clínica *A. baumannii* AbH120-A2 en el que se demostró que su gran capacidad para adherirse a las células epiteliales humanas A549 se debía en parte al sistema de secreción de dos componentes FhaB/FhaC. La delección del gen *fhaC* resultó en un descenso muy significativo de la adherencia de esta bacteria a las células epiteliales. Además, se ha demostrado que este sistema interacciona con la fibronectina presente en las células eucariotas (142).

# Introducción

---

Un estudio del proteoma completo de las células de *A. baumannii* formando *pellicles* confirmó la correlación entre la capacidad para formar *pellicles* y la virulencia bacteriana. En dicho estudio se identificaron numerosos factores de virulencia regulados positivamente durante el crecimiento de los *pellicles*, entre los que se encontraron proteínas del T6SS (143).

## 4.3.5. Quorum sensing

La densidad bacteriana es otro mecanismo mediante el cual las bacterias controlan la adherencia y la formación de *biofilm* (56, 104). En un análisis transcriptómico de células sésiles de *A. baumannii* ATCC 17978 comparado con células planctónicas se observó que varios de los genes que estaban sobreexpresados en las células del *biofilm* estaban involucrados en el *quorum sensing*. La delección del gen A1S\_0114, el cual codifica una proteína transportadora de grupos acilo, demostró la implicación del gen en la formación de *biofilm* (121) y en la adherencia a células epiteliales humanas (144). Inserciones en los genes A1S\_0112 y A1S\_0115, genes relacionados con el *quorum sensing*, en la cepa ATCC 17978, causaron una pérdida en su capacidad para formar *pellicles* (145).

Además, se vió que la cepa clínica *A. nosocomialis* M2 produce una N-acil homoserín lactona, producto de la sintasa *Abal*, la cual es importante para el desarrollo del *biofilm* en superficies abióticas. La eliminación del gen *abal* causó una disminución en la capacidad de formar *biofilm* en comparación con la cepa salvaje (146).

## 4.4. Sistemas de captación de hierro

El hierro es un elemento esencial para el crecimiento de la mayoría de las bacterias debido a su actividad redox y su papel en muchas reacciones vitales, ya que actúa como cofactor de una gran variedad de enzimas (147). El hierro se puede encontrar en dos estados:  $\text{Fe}^{2+}$  (hierro ferroso) y  $\text{Fe}^{3+}$  (hierro férrico). El  $\text{Fe}^{2+}$  es soluble y accesible para las bacterias ya que puede difundirse a través de la membrana celular. Sin embargo,

en presencia de  $O_2$  y  $pH \geq 7$  se oxida a  $Fe^{3+}$ , siendo insoluble y no biodisponible. En los tejidos del huésped el hierro se encuentra unido a la hemoglobina o bien almacenado intracelularmente en forma de ferritina. También puede estar quelado por la transferrina en el suero o por la lactoferrina en las superficies mucosas. El 80% del hierro en humanos se encuentra formando parte del grupo hemo y el hierro que queda libre no es suficiente para suplir los requerimientos de las bacterias patógenas (148).

Durante la infección, las bacterias y el huésped compiten por el hierro y su biodisponibilidad será determinante en el curso de la infección a favor del patógeno o del huésped. Por un lado, el huésped ha desarrollado una serie de estrategias con la finalidad de restringir la cantidad de hierro disponible y, por otro lado, las bacterias han desarrollado múltiples estrategias para captar el hierro ya que un suministro suficiente de este metal está relacionado con la proliferación, virulencia y persistencia del patógeno (149-151).

En respuesta a la limitación de hierro, la mayoría de las bacterias aeróbicas expresan sistemas de captación de hierro de alta afinidad que implicados en la producción, exportación y absorción de quelantes de  $Fe^{3+}$  conocidos como sideróforos. A veces, la captación de hierro a través de sideróforos no es suficiente ya que el hierro libre en vertebrados es extremadamente limitado. De esta forma, algunas bacterias patógenas son capaces de utilizar el grupo hemo de la hemoglobina, hemopexina y haptoglobina como fuente de hierro. Además, la transferrina y la lactoferrina también pueden ser utilizadas como fuente de hierro por algunas especies bacterianas. Para la asimilación de estos compuestos las bacterias necesitan unos sistemas de captación específicos (147). *A. baumannii* no es capaz de obtener hierro de la transferrina y la lactoferrina ya que en su genoma no hay genes que codifican proteínas involucradas en estas funciones (152).

#### **4.4.1 Captación del grupo hemo**

Las bacterias poseen dos mecanismos para captar el grupo hemo. El primer mecanismo consiste en la captura directa del grupo hemo o la adquisición del grupo hemo asociado a hemoproteínas. Para ello, las bacterias patógenas secretan exotoxinas

# Introducción

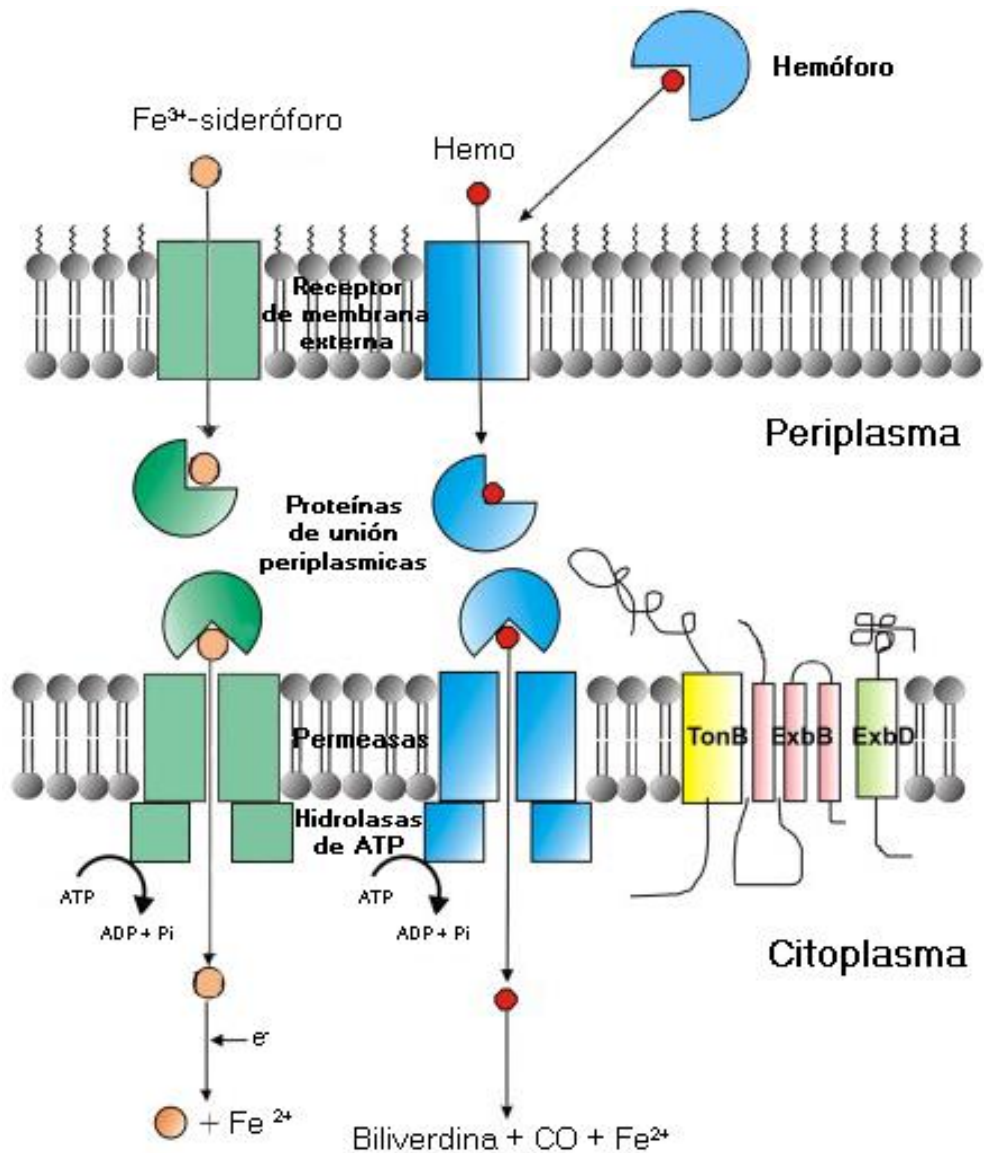
---

que permiten la liberación del grupo hemo a partir de estas proteínas portadoras (153). El segundo mecanismo utiliza unas proteínas específicas llamadas hemóforos que captan el grupo hemo de diferentes fuentes y lo llevan a los receptores (154). Para la internalización del grupo hemo desde el exterior celular son esenciales unos receptores muy específicos. Estos receptores se localizan en la membrana externa y la energía necesaria para la internalización del grupo hemo proviene de la fuerza protón-motriz de la membrana citoplasmática. El sistema TonB formado por las proteínas TonB, ExbB y ExbD transfiere la energía de la membrana citoplasmática a la membrana externa (155). Una vez en el espacio periplásmico, el grupo hemo utiliza el transportador ABC para pasar al citosol. La composición típica de estos transportadores consiste en (i) una o varias proteínas de unión periplásmicas, (ii) una o dos proteínas de membrana diferentes, y (iii) una o dos ATP hidrolasas diferentes que aportan la energía al sistema (Figura 4) (147).

*A. baumannii* también posee los mecanismos necesarios para captar hierro a través del transporte y asimilación del grupo hemo. Zimbley y colaboradores (156) realizaron estudios con dos mutantes de *A. baumannii* ATCC 19606 deficientes en un gen implicado en la síntesis y otro en el transporte del sideróforo acinetobactina. Los autores observaron que ambos mutantes eran capaces de crecer en condiciones de ausencia de hierro cuando se suplementaba el medio con hemina.

Estos resultados concuerdan con la observación de que el genoma de la cepa ATCC 17978 tiene un operón policistrónico que codifica supuestas funciones de captura y transporte de hemina y de un sistema de transducción de energía TonBExbBD (156). Antunes y colaboradores (157) demostraron que diferentes cepas podían utilizar este compuesto como una fuente de hierro expresando sistemas de captura y utilización de grupo hemo. Estas observaciones muestran que los genomas de *A. baumannii* contienen genes que codifican proteínas implicadas en la captación y utilización del grupo hemo, un producto del huésped que puede estar disponible para la bacteria en aquellos lugares donde hay daños debido a la infección.





**Figura 4.** Representación esquemática de la vía de captación del grupo hemo y del hierro férrico a través de sideróforos. Imagen modificada de la referencia (153).

#### 4.4.2. Captación de hierro férrico. Sideróforos

En presencia de oxígeno y pH neutro se produce una rápida oxidación del  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$ , compuesto prácticamente inaccesible para los microorganismos. Bajo estas condiciones limitantes de hierro las bacterias sintetizan unos compuestos quelantes de

# Introducción

---

hierro llamados sideróforos, compuestos de bajo peso molecular con una gran afinidad por el hierro (158).

Los sideróforos se pueden clasificar en tres categorías en función de los ligandos que utilicen para quelar el hierro férrico: catecolatos, hidroxamatos y mixtos (155).

El mecanismo de transporte del complejo sideróforo-Fe<sup>3+</sup> es similar al de transporte del hemo. El complejo sideróforo-Fe<sup>3+</sup> interactúa con un receptor específico lo que provoca cambios conformacionales en ciertos dominios de estas proteínas permitiendo el paso del sustrato (159). La energía necesaria para este transporte es suministrada por el complejo de proteínas TonB-EXbD-ExbB. Una vez en el espacio periplásmico, el complejo sideróforo-Fe<sup>3+</sup> se une a las proteínas de unión del transportador tipo ABC para posteriormente ser transportados a través de la membrana al interior de la célula. La energía necesaria para este proceso se obtiene en las subunidades citosólicas del transportador ABC a través de una hidrólisis de ATP (158) (Figura 4).

En *A. baumannii* el sistema mejor caracterizado es la acinetobactina, identificada por primera vez en la cepa ATCC 19606. Este sideróforo tiene una estructura molecular muy similar a la de la anguibactina, un quelante del hierro de alta afinidad sintetizado por el patógeno de peces *Vibrio anguillarum* 775 (160, 161).

Análisis genéticos y funcionales de la cepa ATCC 19606 mostraron una región cromosómica de 32.4-kb que contenía genes involucrados en la biosíntesis, transporte y secreción de la acinetobactina. La inactivación de los genes *bauA* y *basD*, los cuales codifican funciones de transporte y biosíntesis respectivamente, afecta a la capacidad de estos mutantes isogénicos de crecer en condiciones limitantes de hierro. También se observó que dentro de este *cluster* de genes estaba ausente el gen *entA* que codifica la enzima 2,3-dihidro-2,3-dihidroxibenzoato deshidrogenasa. Esta enzima es necesaria para la producción del ácido dihidroxibenzoico (DHBA), compuesto presente en la molécula de acinetobactina. Esto sugiere que *A. baumannii* podría tener más de un locus involucrado en la síntesis de sideróforos (156).

Eijkelkamp y colaboradores (162) describieron cinco *clusters* de genes que podían estar relacionados con la producción de sideróforos y adquisición de hierro. El *cluster* relacionado con la acinetobactina y el llamado *cluster* 1 se encontraron en todos los genomas de las cepas analizadas excepto en la cepa 3899 y en la cepa ambiental *A. baylyi* ADP1. El *cluster* 2 está presente solamente en *A. baumannii* ATCC 17978 y *A. baylyi* ADP1, mientras que el *cluster* 4 parece ser único de la cepa 8399. El *cluster* 5 está presente en todos los genomas excepto en las cepas ATCC 17978 y ADP1.

Gaddy y colaboradores (163) investigaron el papel que tenía la acinetobactina en la virulencia del patógeno *A. baumannii*. En estos experimentos observaron que la interacción inicial entre la cepa tipo ATCC 19606 y las células alveolares humanas A549 era independiente de la producción de las proteínas BasD y BauD, implicadas en la biosíntesis y transporte de la acinetobactina, respectivamente. En contraste, estas proteínas fueron necesarias para que la cepa persistiera dentro de las células alveolares A549 y causase su muerte por apoptosis. Ensayos con *Galleria mellonella* mostraron que la ausencia de estas proteínas reducía significativamente la capacidad de la ATCC 19606 para persistir y matar al huésped. Además, modelos de sepsis en ratón mostraron que la expresión del sistema de adquisición de hierro mediado por acinetobactina es esencial en la cepa ATCC 19606 para causar infección y matar al huésped. En otro estudio se vio que mutaciones en el gen *entA*, esencial para la síntesis de la acinetobactina, redujeron significativamente la capacidad de *A. baumannii* ATCC 19606 de persistir en células epiteliales humanas y disminuyeron su capacidad de infectar y matar larvas de *Galleria mellonella* (164).

#### **4.4.3 Captación de hierro ferroso. Sistemas Feo**

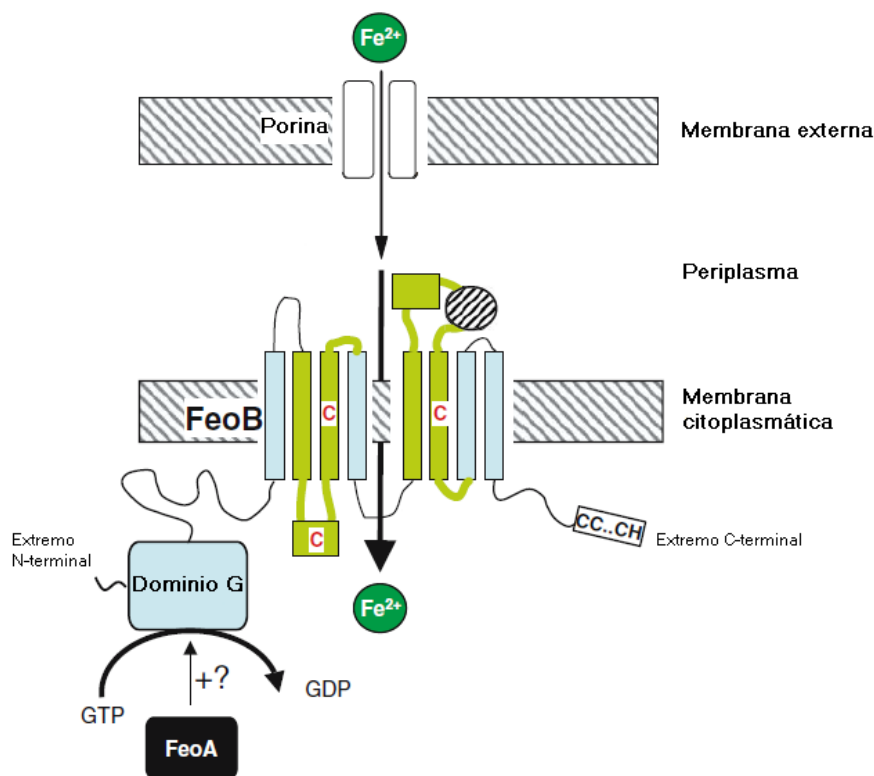
En condiciones de anaerobiosis o bajo pH, el hierro predomina en la forma soluble  $\text{Fe}^{2+}$ . Debido a las propiedades químicas diferentes del  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$  las bacterias necesitan sistemas de transporte de hierro específicos para cada uno de ellos (165).

A diferencia del hierro férrico, el hierro ferroso suele encontrarse libre por lo que las bacterias pueden transportarlo directamente. En bacterias Gram-negativas, el hierro

# Introducción

ferroso difunde al periplasma a través de la porinas de membrana externa donde puede ser transportado al interior celular a través de diferentes sistemas (166). Dentro de todos los sistemas de transporte de hierro, el sistema Feo parece ser la ruta de absorción de hierro ferroso más importante (165).

El operón *feo* fue descubierto por primera vez en 1987 en la bacteria *E. coli* K12 durante un estudio con varios mutantes en genes que codificaban funciones relacionadas con el transporte de hierro (167). En este trabajo, se identificó una colección de mutantes durante un tratamiento con estreptonigrina, antibiótico que genera radicales libres en presencia de hierro y oxígeno. Fueron seleccionados aquellos mutantes que sobrevivieron al tratamiento y tenían un bajo contenido de hierro en su interior entre los que destacaron los mutantes en el operón *feo*. El sistema Feo de *E. coli* está formado por tres genes: *feoA*, *feoB* y *feoC* (168, 169) (Figura 5).



**Figura 5.** Representación esquemática del sistema de captación de hierro ferroso Feo de *E. coli*. Imagen modificada de la referencia (170).

Un análisis del operón mostró que está regulado por los elementos *fur* y *fnr*, cajas que se localizan antes del operón (168). Se sabe que Fur es un regulador transcripcional de genes relacionados con el transporte de hierro en *E. coli* y muchas otras bacterias. En presencia de hierro, Fur forma el complejo  $Fe^{2+}$ -Fur el cual se une a las cajas Fur del ADN de la bacteria para reprimir la transcripción de los genes. Por otro lado, Fnr es un activador transcripcional de genes de la respiración anaeróbica. Es un sensor de oxígeno que activa la transcripción del operón *feo* en la ausencia de oxígeno. Los genes *feo* se expresan de forma constitutiva. Sin embargo, bajo condiciones de anaerobiosis, la expresión aumenta tres veces (165, 168).

El gen *feoA* codifica una proteína citoplasmática de 75-85 aminoácidos. Dentro del operón, este gen se localiza entre la caja fur y el gen *feoB*. Esta proteína tiene una secuencia de aminoácidos hidrófila y parece que no tiene una secuencia señal en el extremo N-terminal, por lo que es probable que esté localizada en el citosol (170). A pesar de que su función sigue siendo desconocida, se ha sugerido que, debido sus propiedades y estructura, FeoA podría actuar como una proteína activadora de la actividad GTPasa (GAP) (171). Kim y colaboradores (172) demostraron que la interacción entre FeoA y FeoB era necesaria para el transporte de hierro ferroso de *Salmonella enterica* y propusieron que FeoA podía actuar como una GAP para el dominio de proteína G de FeoB. Estos estudios, sin embargo, no mostraron específicamente que FeoA interactuase con el dominio G de FeoB. Por lo tanto, no pudo concluirse que FeoA actúe como un GAP sobre el dominio G de FeoB. Ensayos enzimáticos revelaron que la adición de FeoA de *E. coli* no tuvo un efecto sobre la actividad de hidrólisis del GTP del dominio G FeoB sugiriendo que FeoA no actúa como una GAP como se propuso previamente (171).

El gen *feoB* codifica una proteína transmembrana de 773 aminoácidos y se localiza entre el gen *feoA* y el gen *feoC* (168). Es probable que FeoB actúe como la permeasa a través de la cual el hierro ferroso se transporta al interior de la bacteria. Esta proteína está formada por tres dominios: un dominio de proteína G, un dominio inhibidor de la disociación de GDP (GDI) y un dominio transmembrana (169). El dominio de proteína G y el dominio inhibidor de la disociación de GDP (GDI) se localizan en la región hidrófila N-terminal de la proteína mientras que el dominio transmembrana se

# Introducción

---

localiza en la región C-terminal. Para una proteína G que está suministrando energía a un sistema, su tasa de hidrólisis es de crucial importancia. Cuanto más rápida sea la hidrólisis, más energía proporciona. Si la proteína G está involucrada en la activación o desactivación de una ruta, su afinidad hacia diferentes nucleótidos de guanina actúa como un interruptor. Cuando el dominio G está unido a una molécula de GTP, la ruta está activada, y se inactiva cuando se produce la hidrólisis de GTP a GDP (165, 170, 173). A menudo, se requieren proteínas GAP o factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF) para regular la actividad de hidrólisis o la afinidad de las proteínas G. No se han identificado proteínas GAP o GEF para FeoB. Sin embargo, parece que FeoB ha evolucionado para poseer un regulador interno, el dominio GDI. El dominio GDI se localiza entre el dominio G y el dominio transmembrana y fue inicialmente identificado como un dominio inhibidor de la disociación de GDP. Se vio que este dominio interacciona con el dominio G mejorando la unión de GDP a este mientras que no influye en la unión de GTP ni en la actividad enzimática (174). Hung y colaboradores (175) descubrieron que el dominio de proteína G de FeoB de *E. coli* contenía regiones de unión al  $Fe^{2+}$ . De esta forma el estado funcional de la proteína G podría estar sujeto al control por  $Fe^{2+}$  a través de la interferencia en la unión y / o hidrólisis de nucleótidos. El tercer dominio de FeoB es el dominio transmembrana formado por 8-10 hélices transmembrana localizadas en la membrana citoplasmática. Es el dominio que físicamente transporta el hierro ferroso desde el periplasma al citoplasma bacteriano. El mecanismo por el cual este dominio controla el paso del hierro es desconocido. Teniendo en cuenta estudios estructurales, se cree que el  $Fe^{2+}$  entra en la célula a través del dominio transmembrana mientras que el dominio G informa a la región transmembrana del estado energético de la célula a través de movimientos del dominio GDI.

El gen *feoC* sigue al *feoA* y *feoB* en el operón y se encuentra exclusivamente en  $\gamma$ -proteobacterias. Se observó que FeoC tiene un motivo hélice-bucle-hélice típico de proteínas tipo LysR. Estas proteínas pueden actuar como activadores o represores transcripcionales según la localización de este motivo en la proteína. En el caso de FeoC se localiza en la zona N-terminal, por lo que se podría clasificar como un represor transcripcional. El alineamiento de múltiples proteínas FeoC mostró que posee una

región conservada con cuatro cisteínas donde se podrían unir los *cluster* Fe-S actuando así como sensor de hierro. La unión del *cluster* Fe-S podría resultar en cambios conformacionales en la proteína modificando su afinidad por el DNA (176). Se necesitan más estudios sobre FeoC para confirmar su papel en el transporte de hierro ferroso (165, 170).

Se ha demostrado que el sistema Feo es esencial para la virulencia de muchas bacterias no patógenas, como *E. coli* K12, así como de bacterias patógenas, tales como *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*, *Vibrio cholerae* o *Porphyromonas gingivalis*.

Ensayos de transporte de hierro en *E. coli* mostraron que la delección de *feoA* impedía a la bacteria captar hierro ferroso (167, 168) y que estos mutantes no eran capaces de colonizar el intestino de ratones (177). Igualmente, se vio que en la ausencia de *feoB*, *H. pylori* era incapaz de colonizar la mucosa gástrica de ratón (178). En el caso de *Vibrio cholerae*, la delección del sistema Feo no afectó a la capacidad de colonización de *V. cholerae* en un modelo murino (179). A pesar de esto, este sistema es importante para mantener la homeostasis de hierro en el organismo (180). En otros casos la supervivencia de la bacteria es dependiente de más de un sistema de transporte de hierro (181-183). La delección del gen *feoB* en la cepa de *A. baumannii* ATCC 17978 redujo significativamente la eficacia biológica de esta bacteria durante una infección sistémica en ratón. Además, experimentos *in vitro* mostraron que estos mutantes tenían una supervivencia mucho menor en suero humano y dentro de macrófagos, además de ser hipersensibles a la muerte por péptidos antimicrobianos (184).





# OBJETIVOS



## II. OBJETIVOS

*A. baumannii* ha emergido en los últimos años como un patógeno peligroso causante de un gran número de infecciones y brotes hospitalarios. Esto se debe principalmente a su extraordinaria capacidad para adquirir y desarrollar factores de resistencia y de virulencia adaptándose a todo tipo de ambientes desfavorables. Por ello, se hace necesario el estudio de los diferentes mecanismos que puedan explicar su éxito como patógeno.

La presente tesis doctoral se centró en el estudio y caracterización de dos nuevos factores de virulencia de *A. baumannii*. Los títulos de los tres capítulos que conforman este trabajo, así como los objetivos de cada capítulo, son los siguientes:

**Capítulo I.** Secuenciación y análisis del genoma de la cepa clínica *A. baumannii* MAR002 hiperproductora de *biofilm*.

Objetivo 1. Secuenciar el genoma de la cepa *A. baumannii* MAR002 hiperproductora de *biofilm*.

Objetivo 2. Analizar la secuencia del genoma de la cepa *A. baumannii* MAR002.

**Capítulo II.** Análisis del papel del gen LH92\_11085 en la patogénesis de *A. baumannii* MAR002.

Objetivo 3. Estudiar las características fenotípicas de la cepa *A. baumannii* MAR002.

Objetivo 4. Determinar el papel del gen LH92\_11085 en el fenotipo de la cepa *A. baumannii* MAR002.

**Capítulo III.** Implicación del gen *feoA* en la patogénesis de *A. baumannii*.

Objetivo 5. Analizar los genes de *A. baumannii* ATCC 17978 sobreexpresados durante un proceso de neumonía en ratón.

# Objetivos

---

Objetivo 6. Evaluar el papel del gen *feoA* sobre el eficacia biológica, la formación de biofilm, la adherencia a superficies bióticas y la resistencia al estrés oxidativo de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978.

Objetivo 7. Estudiar la implicación del gen *feoA* en la virulencia *in vivo* de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978.

# CAPÍTULOS



## III. CAPÍTULOS

### Capítulo I. Secuenciación y análisis del genoma de la cepa clínica

#### A. *baumannii* MAR002 hiperproductora de *biofilm*.

##### Resumen

En los últimos años se han producido grandes avances en las técnicas de secuenciación, por lo que se han reducido notablemente los costes y el tiempo necesarios para la obtención de genomas bacterianos. Paralelamente a la evolución en las técnicas de secuenciación, las mejoras en las herramientas bioinformáticas han permitido el análisis de esta cantidad de información. Todo esto ha conducido a la descripción de multitud de genomas bacterianos, permitiendo el estudio simultáneo de muchos microorganismos de interés. El impacto sobre diversos campos de la biología ha sido espectacular.

En este capítulo se muestra el trabajo de secuenciación del genoma de la cepa hiperproductora de *biofilm* *Acinetobacter baumannii* MAR002. Dicho trabajo se recoge en la publicación Álvarez-Fraga L, López M, Merino M, Rumbo-Feal S, Tomás M, Bou G, Poza M. 2015. Draft genome sequence of the biofilm-hyperproducing *Acinetobacter baumannii* clinical strain MAR002. *Genome Announc* 3(4):e00824-15. doi:10.1128/genomeA.00824-15 que se anexa a continuación.

La cepa *A. baumannii* MAR002 fue aislada a partir de una herida de un paciente en el Hospital del Mar de Barcelona en el año 2010 durante el II Estudio Español de Colonizaciones/Infecciones por *Acinetobacter baumannii* (GEIH/REIPI-Ab2010). Se analizó la capacidad de formar *biofilm* de 172 aislamientos clínicos pertenecientes a este estudio. *A. baumannii* MAR002 destacó por ser capaz de formar 10 veces más *biofilm* que la cepa tipo *A. baumannii* ATCC 17978. Por esta razón, *A. baumannii* MAR002 fue seleccionada para la secuenciación y análisis de su genoma.

## Capítulos

---

La secuenciación del genoma de *A. baumannii* MAR002 se llevó a cabo usando un secuenciador GS Junior (Roche) siguiendo los protocolos estándar de secuenciación 454. Se generaron un total de 163,265 lecturas con un tamaño medio de 541.12 pb. El 99.23% de estas lecturas fueron ensambladas en 119 *contigs* que posteriormente se ordenaron y unieron hasta formar 2 *scaffolds*. Las secuencias de estos *scaffolds* se depositaron en el GenBank (códigos de acceso, JRHB01000001 y JRHB01000002). La anotación del genoma se realizó utilizando el programa de anotación de genomas procariotas del NCBI. El tamaño estimado del genoma resultó ser de 3.72 Mb, mostrando un contenido de G+C de 39.09%, un total de 3.300 regiones codificantes, 75 pseudogenes, 60 ARNt, y 6 *clusters* de ARNr.



## Artículo



## Draft Genome Sequence of the Biofilm-Hyperproducing *Acinetobacter baumannii* Clinical Strain MAR002

Laura Álvarez-Fraga, María López, María Merino, Soraya Rumbo-Feal, María Tomás, Germán Bou, Margarita Poza

Departamento de Microbiología, Instituto de Investigación Biomédica (INIBIC), Complejo Hospitalario Universitario (CHUAC), Universidad de A Coruña (UDC), A Coruña, Spain

We report the draft genome sequence of *Acinetobacter baumannii* strain MAR002, a biofilm-hyperproducing clinical strain isolated during the study CP/09/0033 (GEIH/REIPI-Ab2010, Spain). The genome of *A. baumannii* MAR002 has an approximate length of 3,717,929 bp and 3,300 protein-coding sequences, with a C+G content of 39.09%.

Received 17 June 2015 Accepted 22 June 2015 Published 23 July 2015

**Citation** Álvarez-Fraga L, López M, Merino M, Rumbo-Feal S, Tomás M, Bou G, Poza M. 2015. Draft genome sequence of the biofilm-hyperproducing *Acinetobacter baumannii* clinical strain MAR002. *Genome Announc* 3(4):e00824-15. doi:10.1128/genomeA.00824-15.

**Copyright** © 2015 Álvarez-Fraga et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 3.0 Unported license](https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/).

Address correspondence to Germán Bou, [german.bou.avevalo@sergas.es](mailto:german.bou.avevalo@sergas.es), or Margarita Poza, [margarita.poza.dominguez@sergas.es](mailto:margarita.poza.dominguez@sergas.es).

*Acinetobacter baumannii* is a nonfermentative Gram-negative coccobacillus. Although this species is a normal inhabitant of the human skin flora, intestinal tract, and respiratory system, it has been shown to cause nosocomial infections, particularly in immunocompromised individuals (1, 2). Biofilm formation is frequent in clinical strains of *A. baumannii* and is an important requirement for chronic colonization of human tissues and persistence in hospital surfaces and medical devices (3, 4). In this study, we report a draft genome sequence of the biofilm-hyperproducing *A. baumannii* strain MAR002, isolated from a wound sample collected from a patient. Genomic DNA was isolated using the Wizard genomic DNA purification kit (Promega) following the manufacturer's protocols. Genome sequencing was performed using the GS Junior sequencer (454 Life Sequencing Inc., Branford, CT). A whole-genome shotgun fragment library was constructed using the rapid library preparation kit from 500 ng of genomic DNA. The GS Junior Titanium emulsion PCR (emPCR) kit (Lib-L) was used for the amplification of the shotgun library. The GS Junior Titanium sequencing kit combined with the GS Junior Titanium PicoTiterPlate kit was used to determine the nucleotide sequence of the amplified DNA library. Standard 454 pyrosequencing protocols were followed. Reads were assembled into contigs using the 454 gsAssembler software program with default parameters. Contigs were reordered onto the *A. baumannii* ATCC 17978 (NCBI reference sequence no. NC\_009085.1), *A. baumannii* AB0057 (NC\_011586.1), *A. baumannii* AYE (NC\_010410.1) and *A. baumannii* AbH12O-A2 (CP009534.1) reference genomes using the contig ordering tool of the Java-based graphical-interface program Mauve (version 2.3.1) (5, 6). Specific nucleotides were designed for PCR procedures followed by Sanger sequencing in order to close gaps. Genome annotation was performed using the NCBI Prokaryotic Genomes Automatic Annotation Pipeline. PHAST (Phage Search Tool) was used to identify prophage sequences within the *A. baumannii* MAR002 genome (7). A total of 163,265 reads (77,182,857 bp) were generated, with an average length of 541.12 bp, and 99.23% of the reads were assembled. A total of 119 contigs were obtained, 111 of which were large contigs

(>500 bp) with lengths between 574 bp and 170,823 bp. The average size of these large contigs was 32,989 bp, and the  $N_{50}$  was 61,192 bp. After the contig assembly two scaffolds were obtained, scaffold 01 with a length of 2,960,191 bp and a 38.92% G+C content and scaffold 02 with a length of 757,739 bp and a 39.70% G+C content. The estimated complete genome size was 3.72 Mb, with a G+C content of 39.09%. A total of 3,300 protein-coding sequences, 75 pseudogenes, 69 tRNAs, and 6 rRNA clusters were predicted. Using the RAST program, *A. baumannii* AYE, *A. baumannii* ACICU, and *A. baumannii* AB900 were identified as the closest neighbors, with scores of 535, 515, and 492, respectively (8, 9). PHAST analysis revealed a putative intact phage integrated in the genome similar to *Acinetobacter* phage BphiB1251 (NC\_019541.1), with a length of 54.1 kb, 62 protein-coding sequences, and a G+C content of 36.99%.

**Nucleotide sequence accession numbers.** This whole-genome shotgun project has been deposited at GenBank into two scaffolds under the accession numbers [JRHB01000001](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclseq/JRHB01000001) and [JRHB01000002](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclseq/JRHB01000002).

### ACKNOWLEDGMENTS

The results of this work have been funded by grants PI11/01034 and P14/000059 to M.P., PI08/1638 and PI12/00552 to G.B., and PI10/00056 and PI13/02390 to M.T., integrated in the National Plan for Scientific Research, Development and Technological Innovation 2008–2011 and 2013–2016, and funded by the ISCIII General Subdirection of Assessment and Promotion of the Research—European Regional Development Fund (FEDER) “A way of making Europe” and also by the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015). We thank grant CP/09/0033 (GEIH/REIPI-Ab2010) from Instituto de Salud Carlos III—Ministerio Economía y Competitividad (Spain) for providing the MAR002 strain.

### REFERENCES

1. Del Mar Tomas M, Cartelle M, Pertega S, Beceiro A, Llinares P, Canle D, Molina F, Villanueva R, Cisneros JM, Bou G. 2005. Hospital outbreak caused by a carbapenem-resistant strain of *Acinetobacter baumannii*: patient prognosis and risk-factors for colonisation and infection. *Clin Micro*

- biol Infect 11:540–546. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01184.x>.
2. Bergogne-Bérézin E. 2007. The increasing role of *Acinetobacter* species as nosocomial pathogens. *Curr Infect Dis Rep* 3:440–444. <http://dx.doi.org/10.1007/s11908-007-1011-2>.
  3. Rodríguez-Baño J, Martí S, Soto S, Fernández-Cuenca F, Cisneros JM, Pachón J, Pascual A, Martínez-Martínez L, McQueary C, Actis LA, Vila J, Spanish Group for the Study of Nosocomial Infections (GEIH). 2008. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: associated features and clinical implications. *Clin Microbiol Infect* 14:276–278. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01916.x>.
  4. Dijkshoorn L, Nemeč A, Seifert H. 2007. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol* 5:939–951. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1789>.
  5. Darling AC, Mau B, Blattner FR, Perna NT. 2004. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Res* 14:1394–1403. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.2289704>.
  6. Rissman AI, Mau B, Biehl BS, Darling AE, Glasner JD, Perna NT. 2009. Reordering contigs of draft genomes using the Mauve aligner. *Bioinformatics* 25:2071–2073. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btp356>.
  7. Zhou Y, Liang Y, Lynch KH, Dennis JJ, Wishart DS. 2011. PHAST: a fast phage search tool. *Nucleic Acids Res* 39:W347–W352. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkr485>.
  8. Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formisano K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O. 2008. The RAST server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics* 9:75. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>.
  9. Overbeek R, Olson R, Pusch GD, Olsen GJ, Davis JJ, Disz T, Edwards RA, Gerdes S, Parrello B, Shukla M, Vonstein V, Wattam AR, Xia F, Stevens R. 2014. The SEED and the rapid annotation of microbial genomes using subsystems technology (RAST). *Nucleic Acids Res* 42:D206–D214. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkt1226>.

### Capítulo II. Análisis del papel del gen LH92\_11085 en la patogénesis de *A. baumannii* MAR002.

#### Resumen

En los últimos años, *A. baumannii* ha adquirido gran importancia en el ámbito de la microbiología clínica debido al incremento de las infecciones y brotes hospitalarios causados por este microorganismo (16, 17, 185). Estos brotes resultan muy difíciles de controlar debido a la gran capacidad que tiene este patógeno para desarrollar mecanismos de resistencia a antibióticos y sobrevivir en condiciones desfavorables.

La colonización por *A. baumannii* de mucosas o instrumental médico, como pueden ser catéteres o tubos endotraqueales, puede evolucionar hacia la formación de *biofilm* lo que aumenta el riesgo de bacteriemias e infecciones respiratorias graves.

La capacidad de *A. baumannii* de adherirse y formar *biofilm*, tanto en superficies bióticas como abióticas, puede explicar parte del éxito que tiene este patógeno dentro del ambiente hospitalario, ya que esta forma de vida sésil le permite escapar de la acción de los antibióticos y otros agentes antimicrobianos, además de evadir la respuesta inmune del huésped.

En el presente capítulo se describe el trabajo recogido en la publicación Laura Álvarez-Fraga, Astrid Pérez, Soraya Rumbo-Feal, María Merino, Juan Andrés Vallejo, Emily J. Ohneck, Richard E. Edelman, Alejandro Beceiro, Juan C. Vázquez-Ucha, Jaione Valle, Luis A. Actis, Germán Bou & Margarita Poza (2016) Analysis of the role of the LH92\_11085 gene of a biofilm hyper-producing *Acinetobacter baumannii* strain on biofilm formation and attachment to eukaryotic cells, *Virulence*, 7:4, 443-455, DOI: 10.1080/21505594.2016.1145335 que se anexa a continuación.

Los estudios fenotípicos de la cepa *A. baumannii* MAR002 revelaron su extraordinaria capacidad de formar *biofilm* y de adherirse a células epiteliales humanas. Además, los análisis de microscopía electrónica de transmisión mostraron la presencia en

# Capítulos

---

la superficie celular de dos tipos de pili. Tras analizar el genoma de esta cepa (Capítulo I), se identificó un gen que codificaba la subunidad mayor de un pilus de tipo chaperona-usher. Dicho gen se encontraba sobreexpresado 25 veces en células sésiles asociadas al *biofilm* en comparación con células libres planctónicas.

El siguiente objetivo consistió, por tanto, en el estudio del papel de este gen, LH92\_11085, en la patogénesis de *A. baumannii* MAR002.

La delección de este gen redujo de forma significativa la capacidad de MAR002 de formar un *biofilm* tridimensional y de adherirse a células epiteliales humanas. Además, los análisis mediante microscopía electrónica de transmisión del mutante isogénico, revelaron la ausencia de uno de los dos tipos de pili que aparecían en la cepa salvaje.

El papel del gen LH92\_11085 en la virulencia de la cepa *A. baumannii* fue analizado a través de experimentos de viabilidad de células epiteliales humanas. Se observó que, al deleccionar este gen, la virulencia de *A. baumannii* MAR002 se reducía significativamente.

Estos resultados indicaron el potencial papel del gen LH92\_11085 en la patogénesis de *A. baumannii* MAR002.

## Artículo

VIRULENCE  
2016, VOL. 7, NO. 4, 443–455  
<http://dx.doi.org/10.1080/21505594.2016.1145335>



RESEARCH PAPER

OPEN ACCESS

## Analysis of the role of the LH92\_11085 gene of a biofilm hyper-producing *Acinetobacter baumannii* strain on biofilm formation and attachment to eukaryotic cells

Laura Álvarez-Fraga<sup>a,†</sup>, Astrid Pérez<sup>a,b,c,†</sup>, Soraya Rumbo-Feal<sup>a</sup>, María Merino<sup>a</sup>, Juan Andrés Vallejo<sup>a</sup>, Emily J. Ohneck<sup>c</sup>, Richard E. Edelmann<sup>d</sup>, Alejandro Beceiro<sup>a</sup>, Juan C. Vázquez-Ucha<sup>a</sup>, Jaione Valle<sup>e</sup>, Luis A. Actis<sup>b,c</sup>, Germán Bou<sup>a</sup>, and Margarita Poza<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Microbiología, Instituto de Investigación Biomédica (INIBIC), Complejo Hospitalario Universitario (CHUAC), Universidad de A Coruña (UDC), A Coruña, Spain; <sup>b</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad de Santiago de Compostela (USC), Santiago de Compostela, Spain; <sup>c</sup>Department of Microbiology, Miami University, Oxford, OH, USA; <sup>d</sup>Center for Advanced Microscopy and Imaging, Miami University, Oxford, OH, USA; <sup>e</sup>Departamento de Biofilms Microbianos, Instituto de Agrobiotecnología, Navarra, Spain

**ABSTRACT**

*Acinetobacter baumannii* is a nosocomial pathogen that has a considerable ability to survive in the hospital environment partly due to its capacity to form biofilms. The first step in the process of establishing an infection is adherence of the bacteria to target cells. Chaperone-usher pili assembly systems are involved in pilus biogenesis pathways that play an important role in adhesion to host cells and tissues as well as medically relevant surfaces. After screening a collection of strains, a biofilm hyper-producing *A. baumannii* strain (MAR002) was selected to describe potential targets involved in pathogenicity. MAR002 showed a remarkable ability to form biofilm and attach to A549 human alveolar epithelial cells. Analysis of MAR002 using transmission electron microscopy (TEM) showed a significant presence of pili on the bacterial surface. Putative protein-coding genes involved in pili formation were identified based on the newly sequenced genome of MAR002 strain (JRH01000001/2 or NZ\_JRH01000001/2). As assessed by qRT-PCR, the gene LH92\_11085, belonging to the operon LH92\_11070-11085, is overexpressed (*ca.* 25-fold more) in biofilm-associated cells compared to exponential planktonic cells. In the present work we investigate the role of this gene on the MAR002 biofilm phenotype. Scanning electron microscopy (SEM) and biofilm assays showed that inactivation of LH92\_11085 gene significantly reduced bacterial attachment to A549 cells and biofilm formation on plastic, respectively. TEM analysis of the LH92\_11085 mutant showed the absence of long pili formations normally present in the wild-type. These observations indicate the potential role this LH92\_11085 gene could play in the pathobiology of *A. baumannii*.

**ARTICLE HISTORY**

Received 9 December 2015  
Revised 15 January 2016  
Accepted 19 January 2016

**KEYWORDS**

*acinetobacter baumannii*;  
attachment; biofilm;  
pathogenicity; pili; virulence

**Introduction**

*Acinetobacter baumannii* is a non-fermentative, oxidase negative, non-flagellated, Gram-negative coccobacillus that has emerged as an important hospital pathogen causing severe infections in compromised patients, including bacteremia and pneumonia.<sup>1–3</sup> The remarkable ability of this pathogen to develop antibiotic resistance and persist in stressful or otherwise unfavorable conditions makes the prevention

and treatment of the infections caused by this pathogen difficult. Recently, outbreaks caused by multiresistant strains of *A. baumannii* have emerged, causing serious health problems.<sup>4–6</sup> Consequently, *A. baumannii* was recently listed as one of the six most dangerous opportunistic pathogens worldwide.<sup>3,7</sup> The ability of *A. baumannii* to form biofilms may explain its extreme resistance to antibiotics and many other

**CONTACT** Germán Bou german.bou.avevalo@sergas.es; Margarita Poza margarita.poza.dominguez@sergas.es 3<sup>a</sup> planta, Edificio Sur, Hospital Universitario, As Xubias, 15006 A Coruña, Spain

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work.

Supplemental material data for this article can be accessed on the publisher's website.

© 2016 Laura Álvarez-Fraga, Astrid Pérez, Soraya Rumbo-Feal, María Merino, Juan Andrés Vallejo, Emily J. Ohneck, Richard E. Edelmann, Alejandro Beceiro, Juan C. Vázquez-Ucha, Jaione Valle, Luis A. Actis, Germán Bou, and Margarita Poza. Published with license by Taylor & Francis.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. The moral rights of the named author(s) have been asserted.

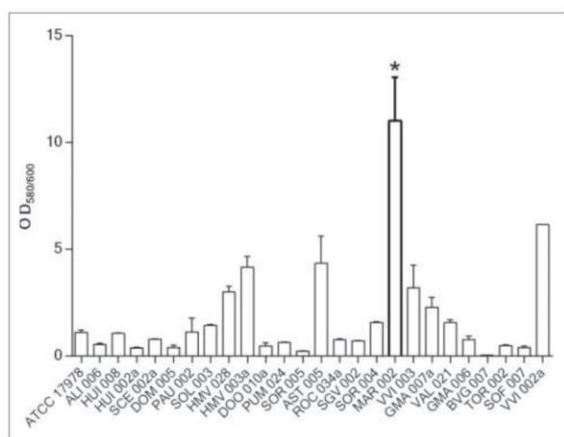
antimicrobial agents as well as its ability to evade host defenses.<sup>8-10</sup> A bacterial biofilm is an organized community of bacteria embedded within a self-produced matrix made of extracellular polymeric substances.<sup>11,12</sup> The *A. baumannii* colonization of mucosal surfaces or contamination of medical devices, such as intravascular catheters or endotracheal intubation devices may result in biofilm formation, increasing the risk of bloodstream and respiratory infections.<sup>13,14</sup> Processes involved in biofilm formation by *A. baumannii* are controlled by complex regulatory networks, including those based on the presence of antibiotic resistance genes, environmental conditions, or cell density.<sup>15-18</sup> A recent study established the complete transcriptome profiles of planktonic and biofilm cells of *A. baumannii* ATCC 17978 revealing 1,621 genes over-expressed in biofilm cells compared to planktonic cells and 55 genes only expressed in sessile bacteria.<sup>19</sup> To date, several gene products have been shown to be involved in adhesiveness and biofilm formation by *A. baumannii*. The CsuA/BABCDE pilus chaperone-usher assembly system, which is regulated by the two-component regulatory system BfmS/BfmR,<sup>20</sup> is essential for the attachment to abiotic surfaces by *A. baumannii* ATCC 19606<sup>T</sup> strain.<sup>21</sup> In addition, the 854-kDa outer membrane protein homolog of the staphylococcal biofilm-associated protein (Bap) was described as involved in the stabilization of *A. baumannii* biofilms.<sup>22</sup> Actually, BAP-like proteins 1 and 2 (BLP1

and BLP2) were shown to be involved in the abilities of *A. baumannii* AYE strain to form biofilm and to adhere to epithelial cells.<sup>23</sup> The outer membrane protein OmpA has also been described in *A. baumannii* to be involved in the development of robust biofilms on plastic and it has been characterized as essential for bacterial attachment to A549 human alveolar epithelial cells.<sup>24</sup> Pili play an important role in adhesion to biotic or abiotic surfaces and in biofilm formation. Pili are 1- to 3- $\mu$ m-long hair-like bacterial appendages with diameters between 2 and 8 nm built by protein subunits called pilins. Chaperone-usher assembly systems are involved in pilus biogenesis pathways that harbor genes coding for usher, chaperone and fimbrial/pilus subunit proteins. The chaperone and usher proteins are the accessory proteins needed to assemble subunits into a pilus and secrete the final assembled appendage.<sup>25</sup> In 2008, Tomaras *et al.*<sup>20</sup> correlated the expression of the *csuA/BABCDE* chaperone-usher pilus assembly operon with the presence of pili around the cell surface. Chabane *et al.*<sup>26</sup> studied the pellicle formation of *A. baumannii* ATCC 17978 and found three subunits of pili encoded by genes A1S\_2218 (CsuA/B), A1S\_1510 and A1S\_2091, assembled by chaperone-usher systems and coding for the most abundant proteins embedded within the pellicle matrix. The recent genome analysis of *A. baumannii* strain MAR002<sup>27</sup> allowed us to identify the LH92\_11085 gene which has a role in adherence and biofilm formation. In the present work the LH92\_11085 gene has been functionally characterized for the first time. We demonstrated that this gene is necessary for mature biofilm formation and adherence to eukaryotic cells being implicated in the virulence of this microorganism.

## Results

### Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii* in a clinical collection

The biofilm formation abilities of 172 *A. baumannii* clinical isolates were investigated (data not shown). Figure 1 shows the data obtained for 25 of these clinical isolates, revealing that most of them had an OD<sub>580/600</sub> ratio between 0.23 and 3.2. In contrast, the MAR002 isolate demonstrated a hyper-producing biofilm phenotype by being able to form *ca.* 10 times more biofilm compared to an ATCC-type strain such as *A. baumannii* 17978. Quantitative analysis of biofilms formed on an abiotic surface was performed and demonstrated that the clinical isolate named MAR002, assigned to the ST271



**Figure 1.** Quantification of biofilm formation in 25 *A. baumannii* clinical isolates selected from a collection of 172 hospital-acquired strains during the 2nd Spanish Study of colonization/infection caused by *A. baumannii* (GEIH/REIPI-Ab2010). Experiments were performed in triplicate and each bar represents the mean  $\pm$  standard deviation (\* P value < 0.0001).

**Table 1** Expression level of genes involved in pili formation detected in planktonic and biofilm-associated cells of the MAR002 strain, assessed by qRT-PCR.

Gene code in MAR002 (JRH01000001/2 and NZ_JRH01000001/2)	Gene code in ATCC 17978 (CP000521.1)	Putative functions in ATCC 17978	Gene expression level	
			Exponential planktonic cells	Biofilm-associated cells
LH92_03275 LH92_RS03235	A1S_0690	FilA	0,0022 ± 0,0009	0,0022 ± 0,0008
LH92_03820 LH92_RS03765	A1S_3569	Hypothetical protein	0,0013 ± 0,0002	0,0033 ± 0,0011
LH92_07655 LH92_RS07535	A1S_1507	Fimbrial protein	0,0002 ± 0,00005	0,0038 ± 0,0028
LH92_07670 LH92_RS07550	A1S_1510	Fimbrial protein	0,1863 ± 0,0958	0,8259 ± 0,1918
LH92_08970 LH92_RS08835	Not found	—	0,3566 ± 0,0633	0,6948 ± 0,0647
LH92_08985 LH92_RS08850	Not found	—	0,0198 ± 0,0035	0,0816 ± 0,0105
LH92_11070 LH92_RS10905	A1S_2088	Hypothetical protein	0,0016 ± 0,0005	0,0054 ± 0,0005
LH92_11085 LH92_RS10920	A1S_2091	Putative exported protein	0,1083 ± 0,0108	2,7051 ± 0,5923
LH92_11710 LH92_RS11540	A1S_2218	CsuA/B	0,4429 ± 0,0770	0,1485 ± 0,0189
LH92_16105 LH92_RS15875	A1S_3167	PilY1	0,0979 ± 0,0169	0,1410 ± 0,0552
LH92_16175 LH92_RS15945	A1S_3177	Fimbrial protein	0,1158 ± 0,0618	0,0697 ± 0,0068

genotype, emerged with a remarkable capacity to form biofilm on a plastic surface ( $P$  value < 0.0001). Therefore, the MAR002 isolate was selected from the clinical strains collection for studying potential targets involved in pathogenesis.

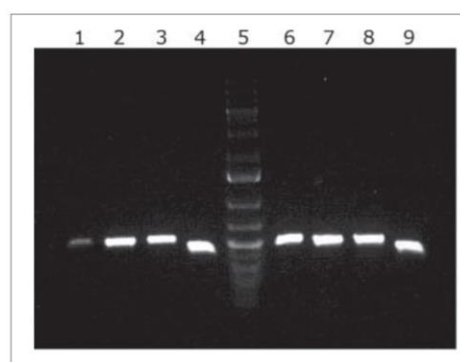
**Expression level of genes coding for pili in the MAR002 strain**

Since pili proteins play an important role in adhesion to biotic and abiotic surfaces, we examined the differential transcription of 11 predicted genes potentially involved in pili formation according to the analysis of the MAR002 genome<sup>27</sup> by qRT-PCR. Table 1 shows the expression level of these genes in planktonic exponential and biofilm-associated cells. During this screening, the gene LH92\_11085 was detected as overexpressed: *ca.* 25-fold more in biofilm-associated cells compared to exponential planktonic bacteria (Table 1). The expression of the LH92\_11085 gene from planktonic and sessile cells of ATCC 17978 was investigated and compared with MAR002. Gene LH92\_11085, annotated in ATCC 17978 as A1S\_2091, was also overexpressed (*ca.* 10-fold more) in ATCC 17978 biofilm-associated cells compared to exponential planktonic cells. In addition, the expression level of this gene in biofilm-associated cells was higher (*ca.* 7.5-fold more) in the MAR002 strain compared to ATCC 17978.

**Characterization of LH92\_11070-11085 operon in A. baumannii MAR002**

LH92\_11085 is a 531-bp long gene that encodes a protein of 176 amino acids. This gene is part of a cluster containing 4 open reading frames. Total RNA was reverse transcribed and amplified to determine if genes from LH92\_11070 to

LH92\_11085 formed a polycistronic operon. As shown in Figure 2, all primer combinations amplified an intergenic fragment from cDNA, demonstrating that genes from LH92\_11070 to LH92\_11085 are co-transcribed as a single operon. Amplification fragments had the same length as those obtained from genomic DNA of *A. baumannii* MAR002. There was not any amplification from total RNA when used as negative control (data not shown). The operon was shown to be composed by 4 genes coding for a fimbrial protein subunit (LH92\_11070), an usher (LH92\_11075), a chaperone (LH92\_11080) and a pilus rod (LH92\_11085).



**Figure 2.** cDNA amplification of genes from the LH92\_11070-11085 operon of *A. baumannii* MAR002 strain. The intergenic regions from genes LH92\_11070-11075, LH92\_11075-11080 and LH92\_11080-11085 are shown in lanes 1, 2 and 3, respectively. Genomic DNA was used as template for positive control (lanes 6 to 8, respectively). Lanes 4 and 9 show the *gyrB* amplification from cDNA and DNA, respectively (positive controls). Lane 5 shows the GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

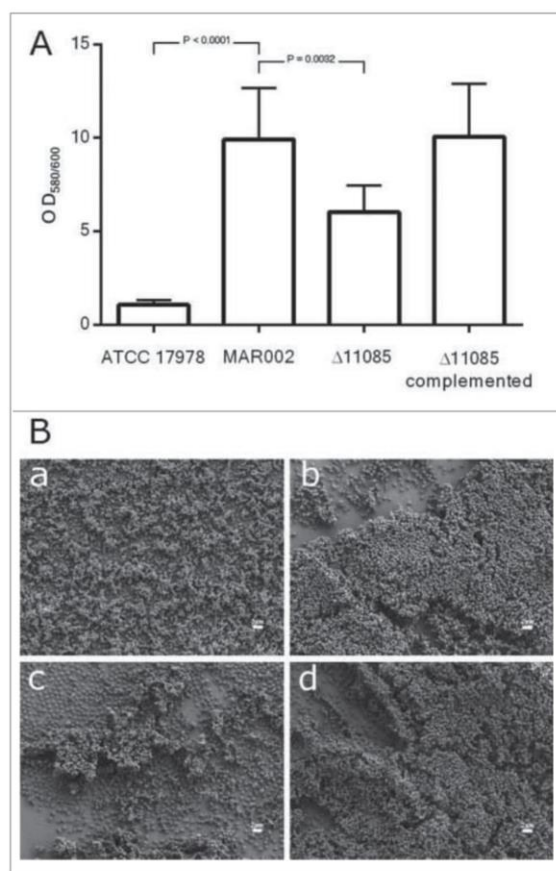
## Construction of the $\Delta 11085$ strain

Structure prediction analysis using Phyre2<sup>28</sup> suggested that the product of the LH92\_11085 gene may have a similar structure to the major type 1 pilus subunit FimA of *Escherichia coli*.<sup>29</sup> To investigate the role of this gene in cellular functions such as biofilm formation and adherence, a LH92\_11085 knockout derivative of MAR002 ( $\Delta 11085$ ) was constructed by deleting part of the LH92\_11085 gene by double crossover recombination, using the plasmid pMo130.<sup>30</sup> The knockout derivative strain construction was confirmed by PCR. The expression level of each gene of the pili cluster was determined and the qRT-PCR results confirmed that only the LH92\_11085 gene expression was null in the  $\Delta 11085$  strain (data not shown).

## Effect of LH92\_11085 gene inactivation on biofilm formation

The MAR002  $\Delta 11085$  isogenic derivative described above was used to investigate the role of this gene in biofilm formation. Quantitative biofilm assays proved that there was a significant difference between the biofilms formed by the MAR002 parental strain and the  $\Delta 11085$  mutant, which showed a biofilm deficient phenotype (Fig. 3A). The inactivation of LH92\_11085 gene led to a significantly reduced biofilm formation compared with that formed by the parental strain under the same experimental conditions ( $P$  value 0.0032) (Fig. 3A). Complementation of the knockout strain with the parental allele ( $\Delta 11085$  complemented) restored the wild-type biofilm formation phenotype (Fig. 3A).

A deeper analysis of biofilm structures using SEM showed the role of LH92\_11085 gene on biofilm architecture. Unlike strain ATCC 17978, which is a poor biofilm former (micrograph a, Fig 3B), MAR002 showed a remarkable capacity to attach to and form a multilayered mature and three-dimensional organized biofilm on the analyzed surface including at the liquid-air interface (micrograph b, Fig. 3B). MAR002 also showed multilayered mature biofilm on both above and below areas of the liquid-air interface (data not shown). However, the  $\Delta 11085$  strain formed significantly simpler and fewer cell aggregates at the liquid-air interface. Mostly, this mutant strain forms unorganized single layers of adherent cells on the analyzed surfaces (micrograph c, Fig 3B). The complementation of the mutant strain with a plasmid copy of the parental allele showed the formation of biofilm with a three-dimensional structure similar to that displayed by MAR002 parental strain (micrograph d, Fig. 3B). These results are in agreement with the data obtained with crystal violet biofilm assays (Fig. 3A).

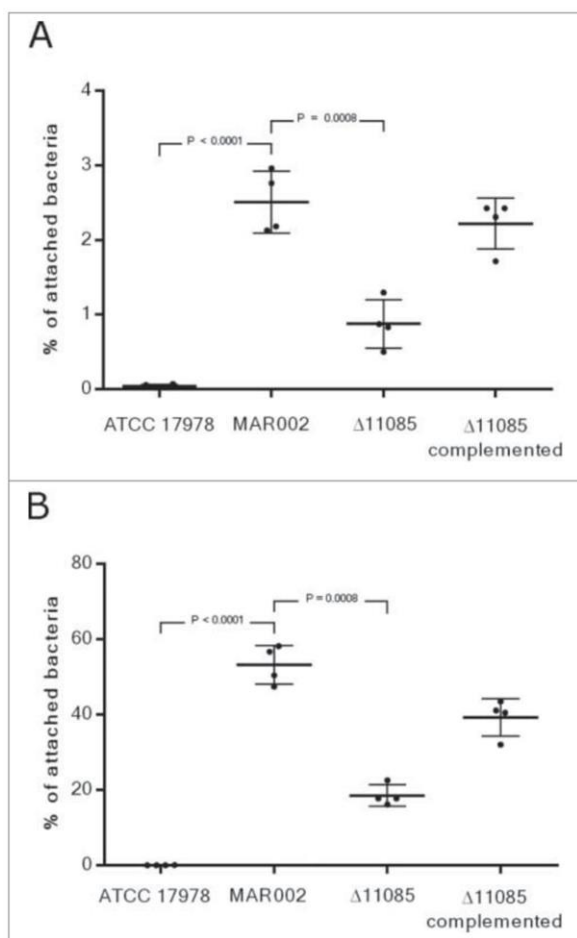


**Figure 3.** A) Quantification of biofilm formation by crystal violet staining. Eight independent replicates were done. Student's t-test was done, values are means and bars indicate the standard deviation. B) SEM analysis of bacterial biofilm on plastic surface at the liquid-air interface of the *A. baumannii* strains a) ATCC 17978, b) MAR002, c) MAR002 $\Delta 11085$  and d) MAR002 $\Delta 11085$  complemented. All micrographs were taken at 5,000x magnification. Bars indicate the scale marks (2  $\mu$ m).

## Effect of LH92\_11085 gene inactivation on attachment to eukaryotic cells

The interaction of MAR002 and its derivative strains with a biotic surface was also examined. To address this issue, A549 human alveolar epithelial cells were infected with ATCC 17978, MAR002,  $\Delta 11085$  or the  $\Delta 11085$  complemented strain to determine their ability to attach to eukaryotic cells and thus, to investigate the role of the LH92\_11085 gene in adherence. A549 alveolar cells were infected for 3 and 24 h showing that MAR002 adhered to A549 cells ca. 60-fold and 1000-fold more than ATCC 17978, respectively ( $P$  value < 0.0001), which was used as a non-adherent control strain (Fig. 4). After 3 h of incubation 2.5% of MAR002 cells attached to A549 cells. Figure 4A also shows how the





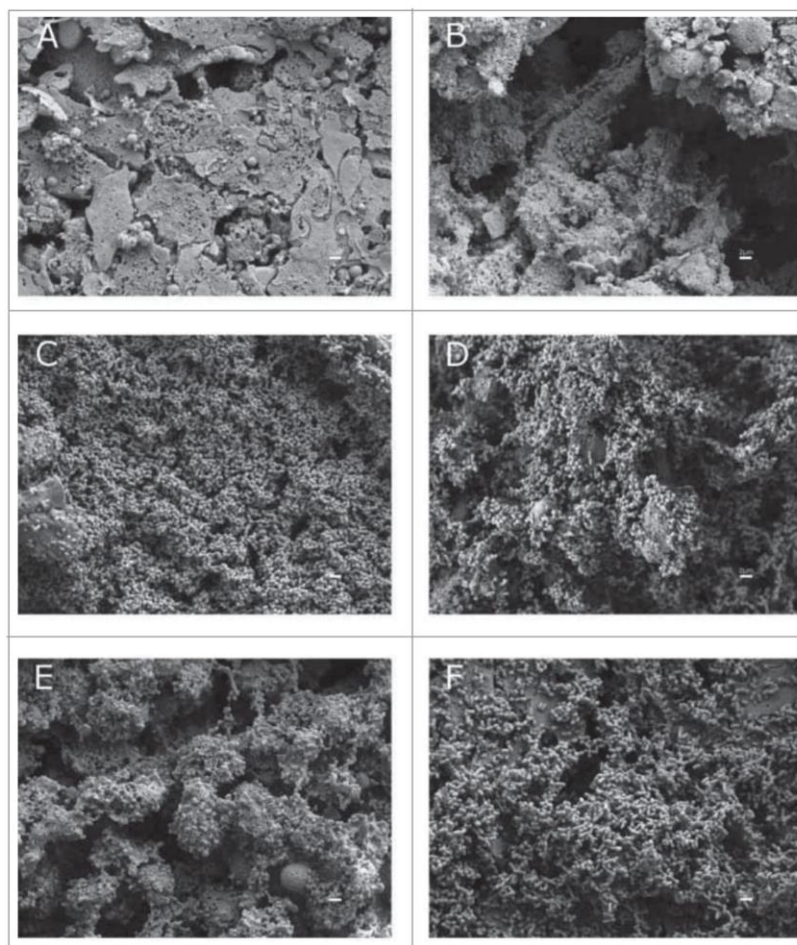
**Figure 4.** Quantification of bacterial adhesion to A549 human alveolar epithelial cells by *A. baumannii* ATCC 17978, MAR002, MAR002Δ11085 (Δ11085) and MAR002Δ11085 complemented (Δ11085 complemented). A) Percentage of attached bacteria after 3 h of infection. B) Percentage of attached bacteria after 24 h of infection. Four independent replicates were performed. T-student test were done and bars indicate the standard deviation.

lack of LH92\_11085 gene significantly reduced the attachment of MAR002 to A549 cells, resulting in only 0.9% of bacteria attached ( $P$  value 0.0008). After 24 h of incubation the number of attached MAR002 cells reached the 53% and the Δ11085 derivative strain showed a reduced adherence phenotype (18%,  $P$  value 0.0008) (Fig. 4B). When the mutant strain was complemented the phenotype was restored, with 2.20% and 39% of bacteria attached to the epithelial cells, at 3 and 24 h respectively. Further, invasiveness experiments performed after 24 h of incubation showed that just 0.5 % and 0.2 % of MAR002 and Δ11085 mutant cells, respectively, were able to invade the eukaryotic cells (data not shown).

SEM analysis confirmed that the ability of the LH92\_11085-deficient strain to attach to A549 cells was reduced (Fig. 5). Microscopy observations and attachment assays showed that parental and knockout complemented strains were able to attach to A549 cells at a similar level, while the Δ11085 mutant strain showed a reduced attachment phenotype (Fig. 5). Only the parental strain was able to form three-dimensional biofilm structures on the top of the polarized A549 cells (micrograph C, Fig 5). Damage of A549 cells can be assessed by the amount of surfactant present on top of the polarized A549 cells. The MAR002 strain and its derivative mutant caused serious damage on A549 polarized cells as compared with the ATCC 17978 strain (micrographs D and E, Fig. 5). Micrograph A (Fig. 5) shows uninfected polarized A549 cells covered by surfactant, which represents a healthy monolayer. The A549 cells still show surfactant after 72 h from infection with the ATCC 17978 strain (micrograph B, Fig. 5) while surfactant has gone in the case of the A549 cells infected with the MAR002 strain under the same conditions (micrograph D, Fig. 5). Although the Δ11085 mutant strain showed a considerable reduction in the amount of adhered bacteria, the lack of surfactant indicated that the polarized cells were damaged (micrograph E, Fig. 5). In the case of the complemented strain (micrograph F, Fig. 5), surfactant can still be seen underneath the A549 cells, which indicates that this strain produces less damage than the parental strain, but also partially restores the attachment phenotype.

#### Cell surface structures in MAR002 and its derivative strains

Bacteria produce numerous cell surface structures that can be used in cell adhesion and attachment to surfaces. We investigated the production of pili in *A. baumannii* MAR002 and derivative strains, under the same culture conditions used in the biofilm assays previously described, using negative staining and transmission electron microscopy (TEM). Examination of the surface appendages produced by these strains revealed quantitative and qualitative differences among the examined strains. Pili-like structures around ATCC 17978 cells are very scarce as shown in micrograph A (Fig. 6) where only one pilus-like formation is marked with a white arrow. In contrast, TEM showed abundant pili-like structures around the parental MAR002 cells (micrograph B, Fig 6). The MAR002 strain possesses at least two distinct pili-like structures, (i) shorter bundle-forming pili with a length of 200-300 nm (marked with black arrows) very abundant and distributed all around the cell surface and (ii) longer thin type of pili (marked with



**Figure 5.** SEM analysis of bacterial attachment to A549 human alveolar epithelial cells. Uninfected and healthy A549 cells covered by surfactant are shown in micrograph A as a negative control. A549 cells were infected with *A. baumannii* ATCC 17978 strain (B), with the MAR002 parental strain (C) and (D), with the MAR002 mutant strain lacking LH92\_11085 ( $\Delta$ 11085) (E) or the mutant strain ( $\Delta$ 11085) complemented (F). All micrographs were taken at 5,000x magnification. Bars indicate the scale (2  $\mu$ m).

white arrows) less abundant and located in certain points around the cell surface. However, only the shorter pili formations (marked with black arrows) could be found in the LH92\_11085 null cells (micrograph C, Fig. 6). Finally, the complemented knockout strain displayed an increased amount of the longer type of pili (marked with white arrows) as shown in micrograph D (Fig. 6).

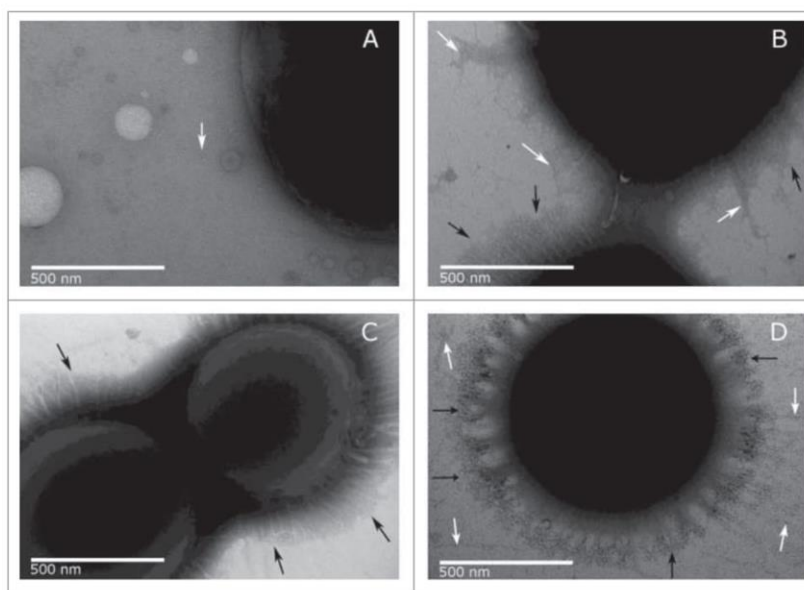
### **Role of LH92\_11085 gene in virulence of MAR002**

The ability of *A. baumannii* MA002 and its derivative mutant  $\Delta$ 11085 strain to reduce the viability of A549 human alveolar epithelial cells was assessed using LIVE/DEAD staining and fluorescence microscopy. The percentage of dead A549 cells was measured after 24 h of infection. As shown in Figure 7, the MAR002 strain

showed an increased virulence (24 % of A549 cell death) compared to *A. baumannii* ATCC 17978 (19% of cell death), being the difference statistically significant with a *P* value of 0.0210. When the LH92\_11085 gene was deleted, the virulence was significantly reduced (*P* value 0.0086), resulting in 18% of dead cells. The  $\Delta$ 11085 complemented strain restored the phenotype giving a 34% of cell death.

### **Discussion**

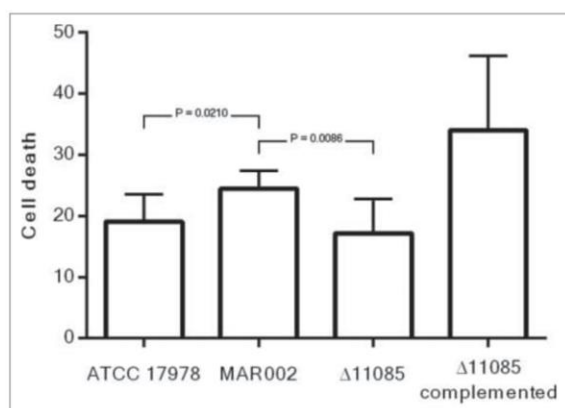
Multiple factors seem to contribute to the pathogenicity of *Acinetobacter baumannii* and its success as an infective agent. The capacity of *A. baumannii* to persist in a medical environment could be partly attributed to its ability to adhere to human cells and to form biofilm on abiotic



**Figure 6.** TEM images of *A. baumannii* strains ATCC 17978 (A), MAR002 (B), MAR002Δ11085 (C) and complemented MAR002Δ11085 (D). Images were taken at 50,000x magnification. The longer thin pili present in small amounts are pointed out by white arrows. The shorter thick pili that form a dense halo around the surface are pointed by black arrows. Bars indicate the scale (500 nm).

surfaces. Previous reports have described the ability of certain clinical strains of *A. baumannii* to attach to and to form biofilm, both of them considered as important virulence factors.<sup>10,14,31</sup> Bacteria forming a biofilm are enclosed in a polymeric matrix constituting a protective mechanism to bacterial survival.<sup>8,14,32-34</sup> The MAR002 strain has been assigned to the ST271 genotype which has not been clustered into any International Clonal Lineage<sup>35</sup> or into any emerging group previously classified as higher biofilm

producers.<sup>36</sup> However, during the present work MAR002 was identified as an isolate with a high ability to form biofilm on abiotic surfaces and a remarkable capacity to attach to A549 human alveolar cells when compared to ATCC 17978. These observations make MAR002 a good model strain to identify potential targets involved in the pathogenicity of *A. baumannii*. There are many studies that correlate the ability to form biofilm with the adhesion to eukaryotic cells. For example, Lee *et al.*<sup>31</sup> found a correlation between the ability to form large amounts of biofilm and epithelial cell adherence after a screening of a collection of *A. baumannii* multidrug-resistant isolates. Our electron microscopy data indicate that MAR002 produces at least two types of pili-like structures all around its surface: (i) thick, bundle-forming pili of 200-300 nm that form a dense halo around the bacterial cell surface and (ii) thin, longer pili present in smaller amounts. It was hypothesized that the ability of MAR002 to form biofilm and adhere to A549 human alveolar cells could be due to the presence of this large amount of pili. Thus, based on this observation, a study of genes that could somehow be involved in pili production was performed in order to explain the hyperpiliation phenotype as well as the high biofilm and attachment abilities of this strain. The expression level analysis of some of the pili genes identified in the newly sequenced genome of *A. baumannii* MAR002 strain<sup>27</sup> gave us three candidate genes, LH92\_11085, LH92\_07670 and LH92\_08970, with a potential role in biofilm formation. LH92\_11085 and LH92\_07670 corresponded with the AIS\_2091 and



**Figure 7.** Quantification of A549 cell death caused by *A. baumannii* ATCC 17978, MAR002, MAR002Δ11085 (Δ11085) and MAR002Δ11085 complemented (Δ11085 complemented). Four independent replicates were performed. T-student test were done and bars indicate the standard deviation.

A1S\_1510 genes in ATCC 17978 strain whereas LH92\_08970 was not found in the ATCC 17978 genome. In a recent work, the pellicle matrix of three representative clinical strains of *A. baumannii* was analyzed.<sup>26</sup> Associated with this pellicle matrix the authors described three subunits of pili assembled by chaperon-usher systems: CsuA/B and the products of genes A1S\_1510 and A1S\_2091. Our findings agree with Chabane *et al.*<sup>26</sup> since we have detected an over-expression of genes A1S\_1510 (LH92\_07670) and A1S\_2091 (LH92\_11085) in biofilm-associated cells when compared to planktonic MAR002 bacteria. The *csuA/B* gene (LH92\_11710) was also found to have higher expression levels in both exponential phase and biofilm associated cells compared with other genes studied; however, this gene was not overexpressed in biofilm cells compared to planktonic exponential cells. The A1S\_1510 gene, which codes for a predicted fimbrial protein in *A. baumannii* ATCC 17978, and the ATCC 19606<sup>T</sup> *csuA/B* gene both have been reported as involved in biofilm formation.<sup>19,21</sup> However, the LH92\_11070-11085 homolog operon previously described in ATCC 17978 (A1S\_2088-2091) has not been functionally characterized although Giles *et al.* suggested its potential role in biofilm formation.<sup>37</sup> Since LH92\_11085 gene showed the highest expression level among the analyzed encoding pili genes, we selected it to investigate whether this gene, integrated into the operon LH92\_11070-11085, plays a role in the biofilm hyper-producing phenotype shown by MAR002. SEM analysis showed that the absence of the LH92\_11085 gene reduced but did not abolish biofilm mass in MAR002. The ability of the LH92\_11085 isogenic-deficient derivative to attach to the plastic surface has been demonstrated although it was not able to form a mature multilayered biofilm. Similar results were found with a homologue of a staphylococcal biofilm-associated protein (Bap), which was shown to be involved in maintaining the mature biofilm architecture in *A. baumannii* 307-0294 strain.<sup>22</sup> Bap protein is involved in the adherence of the *A. baumannii* Ab307 strain to both normal human bronchial epithelial cells and normal human neonatal keratinocytes.<sup>38</sup> Similarly, the BLP1 and BLP2 mutant derivative strains of *A. baumannii* AYE, showed a decrease in biofilm formation and adhesion to A549 cells abilities.<sup>23</sup> In agreement with the results obtained with abiotic surfaces, the LH92\_11085 gene proved to be important for the ability of MAR002 to attach to biotic surfaces, specifically to A549 human alveolar epithelial cells. Data indicated that the LH92\_11085 gene plays an important role in biofilm formation and attachment to A549 polarized cells. TEM analysis was performed in order to detect any change on the pili structures produced by MAR002 and we observed that the longer pili detected in the wild-type strain were more abundant in the complemented strain and did not appear in the knockout strain. This observation led us

to correlate the expression of the LH92\_11085 gene with the presence of the longer pili. The greater abundance of the longer pili in the complemented strain compared to the wild-type could be explained by the higher expression level of the LH92\_11085 gene in the complemented strain than in the wild-type, as assessed by qRT-PCR, which is probably due to the control of a strong promoter harbored in the pWH1266 plasmid as well as the copy number of this shuttle plasmid vector.

The MAR002 LH92\_11070-11085 operon described in the present work belongs to the type I pili systems, previously associated with biofilm formation.<sup>19,21</sup> Using bioinformatic tools this operon was found to have similar structure to the Fim and Pap systems previously described in *E. coli*<sup>25</sup> or to the CsuA/BABCDE pilus chaperone-usher assembly system described in *A. baumannii* strain ATCC 19606<sup>T</sup>.<sup>21</sup> However, when comparing the genetic structures of pili systems it seems that the CsuA/BABCDE system possesses 2 fimbrial subunits more in the pilus tip than the pili system here described. In *A. baumannii* ATCC 19606<sup>T</sup>, the CsuA/BABCDE was characterized as a chaperone-usher pili assembly system involved in adhesion to abiotic surfaces and biofilm formation,<sup>21</sup> while CsuA/BABCDE-independent short pili were shown to be involved in adherence of bacteria to biotic surfaces.<sup>39</sup> However, the LH92\_11085 gene, belonging to the MAR002 LH92\_11070-11085 operon described here, plays a role in the interaction of MAR002 cells with both abiotic and biotic surfaces. The MAR002 pili system seems to be structurally and functionally different from the Pila-based system previously described in *A. baumannii* M2 strain, which belongs to the type IV pili systems and that has been related with twitching motility.<sup>40</sup> Genetic analysis showed that the MAR002 pili system is composed by four genes coding for a fimbrial protein subunit (LH92\_11070), an usher (LH92\_11075), a chaperone (LH92\_11080) and a pilus rod (LH92\_11085). The predicted structure of the protein encoded by the LH92\_11085 gene showed to be similar to FimA of *E. coli*,<sup>29</sup> that belongs to the Fim system, which corresponds to the protein encoded by the A1S\_2091 gene in the ATCC 17978 *A. baumannii* strain. Moreover, its important role in pili subunits formation agrees with those found for FimA and PapA from *E. coli*<sup>25</sup> and also with the CsuA/B described in ATCC 19606<sup>T</sup> strain.<sup>21</sup> Finally, since the lack of the LH92\_11085 gene had an effect on the viability of A549 cells as assessed by live/dead assays as well as on adherence and biofilm formation, we suggest that this gene could be partly responsible for the virulence of the *A. baumannii* MAR002 strain.

In summary, the results presented in this work show the remarkable ability of the *A. baumannii* MAR002 clinical strain to attach to A549 human alveolar epithelial

cells and to form a robust multilayer mature biofilm on plastic surfaces. The LH92\_11085 gene predicted to encode for a pili subunit belongs to a gene operon (LH92\_11070-11085) coding for a functionally uncharacterized *A. baumannii* MAR002 pili assembly and secretion system. Data presented in this report indicate this LH92\_11085 gene is required for the development of a mature biofilm on plastic as well as for the attachment of bacteria to A549 human alveolar cells and the ability to cause eukaryotic cell death. Taken together, these observations indicate the potential role this LH92\_11085 gene could play in the pathobiology of *A. baumannii* and its value as a potential target to impair host pathogen interactions that are critical in the pathogenesis and virulence of this pathogen.

## Material and methods

### Bacterial strains and culture conditions

A total of 172 strains collected during the 2nd Spanish study of colonizations/infections caused by *A. baumannii* (GEIH/REIPI-Ab2010)<sup>41</sup> were used for phenotypic analysis, being 25 representative strains further selected for biofilm formation assays. One of them was *Acinetobacter baumannii* strain MAR002, isolated from a wound sample collected from a patient in the Hospital del Mar (Barcelona, Spain). *A. baumannii* and *Escherichia coli* strains were routinely grown in Luria-Bertani (LB) broth. Agar at 2% was added when necessary. All strains were grown at 37°C with shaking (180 rpm), and stored at -80°C in LB broth containing 10 % glycerol. The concentration of kanamycin (Sigma-Aldrich) used for selection of transformant strains was 50 µg/mL. Swimming broth medium (SB), containing 10 g tryptone/L and 5 g NaCl/L, was used for biofilm analysis. For obtaining planktonic cells, a single colony of both *A. baumannii* MAR002 and ATCC 17978 strains was taken from LB agar plates and grown in 5 mL of LB broth overnight. One mL of the resulting culture was used to inoculate 100 mL of LB broth. Optical density (OD<sub>600nm</sub>) was evaluated each 30 min to determine bacterial growth. Cells were harvested during the exponential phase (OD<sub>600nm</sub> = 0.6) and resuspended in RNA later reagent (Sigma-Aldrich), frozen using liquid nitrogen and stored at -80°C.

### Biofilm generation for qRT-PCR assays

*A. baumannii* MAR002 biofilms used to isolate total RNA for qRT-PCR studies were obtained in the Fermentation Laboratory of the Agrobiotechnology Institute (Navarra, Spain). A sample from an overnight culture of *A. baumannii* grown in LB broth was used to inoculate

60-mL microfermentors (Institute Pasteur, Paris, France), which were then maintained at 37°C for 24 h. The bacterium was grown in LB broth medium under a continuous-flow culture system and continuous aeration consisting of 40 mL of compressed, sterile air/h. Biofilms that formed on the slides were removed with a cell scraper and frozen in liquid nitrogen at -80°C.

### Bioinformatic analysis

Multiple-genome alignment tool from MAUVE software (version 2.3.1) was used for comparative genomics.<sup>42</sup> The 3-dimensional structure of the protein studied was predicted using the Phyre2 server.<sup>28</sup> The Interpro program was used for the functional analysis of proteins.<sup>43</sup> MLST Pasteur database (<http://pubmlst.org/abaumannii/>) was used to determine the sequence type (ST) of *A. baumannii* MAR002 strain.

### RNA extraction and real-time RT-PCR

High Pure RNA Isolation Kit (Roche) was used to isolate RNA from planktonic exponential growth phase cells and sessile biofilm-associated cells. RNA samples were treated with DNase I and purified with RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen). The samples were quantified using a BioDrop µLITE (Isogen Life Science). Real-time reverse transcription-PCR (qRT-PCR) was carried out to determine the expression level of the genes of interest using UPL probes (Roche). The LightCycler 480 RNA Master hydrolysis probes kit and a LightCycler 480 RNA instrument (Roche) were used following the program: initial incubation of 65°C, 3 min, followed by a denaturation step at 95°C for 30 s, 45 cycles at 95°C, 15 s and 60°C, 45 s, and a final elongation step at 40°C, 30 s. Three independent biological replicates were done. The expression level was standardized relative to the transcription level of the housekeeping gene *gyrB*. In order to check whether genes are cotranscribed and belong to a polycistronic operon, the cDNA was obtained from RNA samples using the iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) following the manufacturer's recommendations. The cDNA of MAR002 strain was amplified with GoTaq DNA Polymerase (Promega). Pairs of primers were designed to be complementary to the 3' end of every gene and the 5' end of the next one. Genomic DNA of *A. baumannii* MAR002 was used as template for positive control and total RNA was used as template for the negative control of the amplification. These analyses were done in triplicate. The primers and probes used were those listed in Table S1.

## Quantitative biofilm assay

Biofilm formation was quantified following the procedure described by Tomaras *et al.*,<sup>21</sup> with some modifications. *A. baumannii* was grown on LB agar for 18 h at 37°C and used to inoculate 5 mL of LB broth. Cultures were grown at 37°C with shaking. Overnight cultures were pelleted, washed and resuspended in 5 mL of SB. A 1:100 dilution of each strain was incubated at 37°C for 48 h under static conditions. Growth culture was measured at OD<sub>600</sub> to estimate total cell biomass. Biofilm formation was quantified by staining with crystal violet and solubilisation with ethanol-acetone. The OD<sub>580</sub>/OD<sub>600</sub> ratio was used to normalize the amount of biofilm formed to the total cell content of each sample tested to avoid variations due to differences in bacterial growth under different experimental conditions. Eight independent replicates were performed. Student's t-test was performed to evaluate the statistical significance of observed differences between MAR002 strain and its derivative strains.

## Constructions of knockout strain

Plasmid pMo130 [Genbank: EU862243], a suicide vector containing the genes *xylE*, *sacB* and a kanamycin resistance marker, was used as described by Hamad *et al.*<sup>30</sup> Briefly, 900-1000 bp upstream and downstream regions flanking the gene selected for deletion in *A. baumannii* MAR002 were cloned into the pMo130 vector using primers listed in Table S1. The resulting plasmid was used to transform *A. baumannii* by electroporation. Recombinant colonies representing the first crossover event were obtained using a combination of kanamycin selection and visual detection of XylE activity following the catechol-based method. Bright yellow kanamycin resistant colonies were grown overnight in LB supplemented with 15 % sucrose and then plated on the same agar medium. Second crossover events were then confirmed by PCR using primers listed in Table S1.

## Complementation of stable knockout mutant

To complement the Δ11085 knockout strain, the target gene was amplified from *A. baumannii* MAR002 genomic DNA using the primers listed in Table S1 and then cloned into the *EcoRV* and *BamHI* restriction sites of the pWH1266 plasmid<sup>44</sup> in which a kanamycin resistance cassette was cloned previously using primers listed in Table S1. The construction was used to transform the mutant strain. Transformants were selected on kanamycin-containing plates and confirmed by PCR using primers listed in Table S1.

## Adhesion and invasiveness to A549 human alveolar epithelial cells

Adhesion and invasion abilities were determined following the procedure described by Gaddy *et al.* with some modifications.<sup>24</sup> Briefly, A549 human alveolar epithelial cells were grown in 5 % CO<sub>2</sub> at 37°C in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich) supplemented with 10 % heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and 1 % of penicillin-streptomycin (Gibco). Confluent monolayers were washed twice with saline solution and once with modified Hank's balanced salt solution (mHBSS, same as HBSS but without glucose). Then, A549 cells were infected with 10<sup>5</sup> bacteria *per well* and incubated for 3 and 24 h in mHBSS at 37°C. To determine bacterial adhesion, the infected monolayers were washed three times with saline solution and then lysed in 500 μL of 0.5 % sodium deoxycholate. To determine bacterial invasion A549 cells were infected as described above for 24 h and each well was treated for 2 h with gentamicin (256 μg/mL) before washing. Dilutions of the lysates were plated onto LB agar and incubated at 37°C for 24 h. Colony forming units were counted to determine the % of bacteria that had attached to or invaded A549 cells at 24 h compared to the growth control, this being static conditions and same medium without cells. For 3 h attachment assays, the percentage of bacteria attach to A549 cells was compared with the total amount of infecting bacteria. Four independent replicates were done. T-student tests were performed to evaluate the statistical significance of the observed differences between MAR002 and its derivative strains.

## Transmission electron microscopy (TEM)

Bacterial cells were grown on polystyrene coverslips in SB for 48 h at 37°C without shaking. Coverslips were removed from the culture media, and placed wet into new petridishes. Freshly prepared carbon coated, nitrocellulose substrated TEM grids were placed substrate side down, directly on top of the bacterial cells adherent to the plastic at air-liquid interface and allowed to sit covered for 5 min. Grids were removed and negatively stained with 5 μL of 1.5% (wt/vol) ammonium molybdate for 5 min. The grids were then wicked dry with filter paper and allowed to dry. Images were captured at 120kv with a JEOL 1200-EX II TEM.

## Scanning electron microscopy (SEM)

Overnight cultures of *A. baumannii* were used to inoculate 5 ml of LB in 50-ml conical tubes at a 1:100 dilution. Sterile polystyrene coverslips were placed in the

inoculated 50-mL conical tubes and the tubes were incubated for 48 h at 37°C without shaking as previously described.<sup>24</sup> Coverslips were washed, dehydrated in ethanol, processed with a critical point drier, and sputter coated as described previously.<sup>21</sup> Biofilms formed above, at and below of the liquid-air interface were viewed using a Zeiss Supra Gemini Series 35V scanning electron microscope as described previously.<sup>21</sup>

#### **Polarization of A549 human alveolar epithelial cells and infection with *A. baumannii* for SEM**

A549 human alveolar epithelial cells were routinely maintained in 25 cm<sup>2</sup> tissue culture flasks (BioLite 25 cm<sup>2</sup> Flask, Thermo Fisher Scientific, Rochester, New York) in DMEM medium (Cellgro Mediatech Inc., Manassas, Virginia) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Cellgro Mediatech Inc., Manassas, Virginia) and 1% of 100 µg/mL penicillin-streptomycin (Cellgro Mediatech Inc., Manassas, Virginia) (DMEM). Costar transwell permeable support polycarbonate membrane 24 well plates (Costar Transwell Polyester Supports, Corning Inc., Corning, New York) were preconditioned 24 h prior to seeding with DMEM on both sides of the membrane and incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. DMEM was removed from the conditioned transwell plates and the membranes were seeded with 10<sup>5</sup> A549 cells per membrane. A549 cells were maintained submerged (DMEM on top and bottom) on the transwell membranes for one week. Following the initial week of submerged growth, DMEM was removed from the top of the membrane to allow the A549 cells to polarize and begin secreting surfactant. Cells were polarized for 2 weeks to create a water-tight seal around the membrane as measured by resistance. One day prior to and for the duration of infection, A549 cells were fed DMEM supplemented with 10% heat inactivated FBS without penicillin-streptomycin (DMEM-). Bacteria, previously grown in LB at 37°C for 24 h in a shaking incubator at 180 rpm, were washed and resuspended in Hank's Buffered Salt Solution (HBSS) (Hyclone Laboratories, Inc., Logan, Utah). A concentration of 10<sup>2</sup> bacteria was applied to the apical surface of A549 cells by pipetting 1 µL of suspension onto the center of each membrane. The transwell plate was then incubated and maintained for 72 h at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. After 72 h, the membranes were washed with HBSS to remove secretions and unattached bacterial cells. The membranes were then fixed for 24 h in 4% formaldehyde-HBSS at 4°C. The membranes were then prepared for SEM using the previously described.<sup>21</sup>

#### **LIVE/DEAD fluorescence microscopy on infected A549 monolayers**

A549 human alveolar epithelial cells were grown in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 mg/L of penicillin, and 100 mg/L streptomycin at 37°C in the presence of 10% CO<sub>2</sub>. For cell viability assays, monolayers of A549 cells were grown in 24-well plates to a density of 1 × 10<sup>5</sup> cells per well. Later, the cells were infected with 2 × 10<sup>4</sup> CFU/well of *A. baumannii* in new DMEM without antibiotics and grown for 24 h at 37°C.<sup>45</sup> A Live/Dead Cell Double Staining Kit (Sigma-Aldrich) was used according to the manufacturer's instructions to measure cell viability post-infection. Briefly, at 24 h post-infection, the A549 cells were incubated for 15 min at 37°C with phosphate-buffered saline (PBS) containing a mixture of the two fluorescent molecules to obtain simultaneous fluorescent staining; calcein-AM, is able to stain viable cells (green), while propidium iodide, a nucleus-staining dye that is unable to penetrate the cell membranes of viable cells, can stain only dead cells (red). Microscopic images of the stained cells (alive and dead) were obtained using an inverted fluorescence microscope (Nikon Eclipse Ti) and analyzed with the NIS Elements Br software package. The excitation absorbance of calcein-AM was 490 nm, and emission was at 515 nm, while the excitation range of propidium iodide was 535 nm and emission was 617 nm. At least four replicates of each assay were analyzed, and the statistical significance was determined using Student's t test.

#### **Disclosure of potential conflicts of interest**

No potential conflicts of interest were disclosed.

#### **Funding**

The results of this work have been funded by the Projects PI11/01034 to MP and PI14/00059 to MP and AB and PI12/00552 and PI15/00860 to GB, integrated in the National Plan for Scientific Research, Development and Technological Innovation 2013-2016 and funded by the ISCIII- General Subdirection of Assessment and Promotion of the Research – European Regional Development Fund (FEDER) “A way of making Europe” and Miami University (Ohio, USA) Research Funds. We also thank Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015/0014 to GB), cofinanced by the European Development Regional Fund (EDRF) “A Way to Achieve Europe, Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Economía y Competitividad. A.P. was financially supported by the Galician Plan for Research, Innovation and Growth (I2C Plan 2012-2016). J.A. Vallejo was financially supported by the Sara Borrell Program (ISCIII, Spain CD13/00373). We wish to thank grant GEIH/REIPI-Ab2010 from Instituto de Salud

Carlos III - Ministerio Economía y Competitividad for providing MAR002 strain and M.I. Voskuil for pMo130.

## References

- [1] Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21:538–82; PMID:18625687; <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00058-07>
- [2] Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol* 2007; 5:939–51; PMID:18007677; <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1789>
- [3] Ong CW, Lye DC, Khoo KL, Chua GS, Yeoh SF, Leo YS, Tambyah PA, Chua AC. Severe community-acquired *Acinetobacter baumannii* pneumonia: an emerging highly lethal infectious disease in the Asia-Pacific. *Respirology* 2009; 14:1200–5; PMID:19909464; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1843.2009.01630.x>
- [4] Merino M, Alvarez-Fraga L, Gomez MJ, Aransay AM, Lavin JL, Chaves F, Bou G, Poza M. Complete Genome Sequence of the Multiresistant *Acinetobacter baumannii* Strain AbH120-A2, Isolated during a Large Outbreak in Spain. *Genome Announc* 2014; 2:e01182-14; PMID:25395646; <http://dx.doi.org/10.1128/genomeA.01182-14>
- [5] del Mar Tomas M, Cartelle M, Pertega S, Beceiro A, Llinares P, Canle D, Molina F, Villanueva R, Cisneros JM, Bou G. Hospital outbreak caused by a carbapenem-resistant strain of *Acinetobacter baumannii*: patient prognosis and risk-factors for colonisation and infection. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11:540–6; PMID:15966971; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01184.x>
- [6] Corbella X, Montero A, Pujol M, Dominguez MA, Ayats J, Argerich MJ, Garrigosa F, Ariza J, Gudiol F. Emergence and rapid spread of carbapenem resistance during a large and sustained hospital outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 2000; 38:4086–95; PMID:11060073
- [7] Jones ME, Draghi DC, Thornsberry C, Karlowsky JA, Sahm DF, Wenzel RP. Emerging resistance among bacterial pathogens in the intensive care unit—a European and North American Surveillance study (2000–2002). *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2004; 3:14; PMID:15283864; <http://dx.doi.org/10.1186/1476-0711-3-14>
- [8] Raad II, Mohamed JA, Reitzel RA, Jiang Y, Dvorak TL, Ghannoum MA, Hachem RY, Chaftari AM. The prevention of biofilm colonization by multidrug-resistant pathogens that cause ventilator-associated pneumonia with antimicrobial-coated endotracheal tubes. *Biomaterials* 2011; 32:2689–94; PMID:21295343; <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.12.015>
- [9] Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284:1318–22; PMID:10334980; <http://dx.doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>
- [10] Vidal R, Dominguez M, Urrutia H, Bello H, Gonzalez G, Garcia A, Zemelman R. Biofilm formation by *Acinetobacter baumannii*. *Microbios* 1996; 86:49–58; PMID:8771775
- [11] Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2:95–108; PMID:15040259; <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro821>
- [12] Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 2002; 8:881–90; PMID:12194761; <http://dx.doi.org/10.3201/eid0809.020063>
- [13] Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15:167–93; PMID:11932229; <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002>
- [14] Rodriguez-Bano J, Marti S, Soto S, Fernandez-Cuenca F, Cisneros JM, Pachon J, Pascual A, Martinez-Martinez L, McQueary C, Actis LA, et al. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: associated features and clinical implications. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14:276–8; PMID:18190568; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01916.x>
- [15] Gonzalez RH, Nusblat A, Nudel BC. Detection and characterization of quorum sensing signal molecules in *Acinetobacter* strains. *Microbiol Res* 2001; 155:271–7; PMID:11297357; [http://dx.doi.org/10.1016/S0944-5013\(01\)80004-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0944-5013(01)80004-5)
- [16] Gonzalez RH, Dijkshoorn L, Van den Barselaar M, Nudel C. Quorum sensing signal profile of *Acinetobacter* strains from nosocomial and environmental sources. *Rev Argent Microbiol* 2009; 41:73–8; PMID:19623895
- [17] Niu C, Clemmer KM, Bonomo RA, Rather PN. Isolation and characterization of an autoinducer synthase from *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol* 2008; 190:3386–92; PMID:18281398; <http://dx.doi.org/10.1128/JB.01929-07>
- [18] Cabral MP, Soares NC, Aranda J, Parreira JR, Rumbo C, Poza M, Valle J, Calamia V, Lasa I, Bou G. Proteomic and functional analyses reveal a unique lifestyle for *Acinetobacter baumannii* biofilms and a key role for histidine metabolism. *J Proteome Res* 2011; 10:3399–417; PMID:21612302; <http://dx.doi.org/10.1021/pr101299j>
- [19] Rumbo-Feal S, Gomez MJ, Gayoso C, Alvarez-Fraga L, Cabral MP, Aransay AM, Rodriguez-Ezpeleta N, Fullaondo A, Valle J, Tomas M, et al. Whole transcriptome analysis of *Acinetobacter baumannii* assessed by RNA-sequencing reveals different mRNA expression profiles in biofilm compared to planktonic cells. *PLoS One* 2013; 8:e72968; PMID:24023660; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0072968>
- [20] Tomaras AP, Flagler MJ, Dorsey CW, Gaddy JA, Actis LA. Characterization of a two-component regulatory system from *Acinetobacter baumannii* that controls biofilm formation and cellular morphology. *Microbiology* 2008; 154:3398–409; PMID:18957593; <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.2008/019471-0>
- [21] Tomaras AP, Dorsey CW, Edelmann RE, Actis LA. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology* 2003; 149:3473–84; PMID:14663080; <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.26541-0>
- [22] Loehfelm TW, Luke NR, Campagnari AA. Identification and characterization of an *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein. *J Bacteriol* 2008; 190:1036–44; PMID:18024522; <http://dx.doi.org/10.1128/JB.01416-07>
- [23] De Gregorio E, Del Franco M, Martinucci M, Roscetto E, Zarrilli R, Di Nocera PP. Biofilm-associated proteins: news from *Acinetobacter*. *BMC Genomics* 2015; 16:933;



- PMID:26572057; <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-015-2136-6>
- [24] Gaddy JA, Tomaras AP, Actis LA. The *Acinetobacter baumannii* 19606 *OmpA* protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells. *Infect Immun* 2009; 77:3150–60; PMID:19470746; <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00096-09>
- [25] Busch A, Waksman G. Chaperone-usher pathways: diversity and pilus assembly mechanism. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2012; 367:1112–22; PMID:22411982; <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2011.0206>
- [26] Nait Chabane Y, Marti S, Rihouey C, Alexandre S, Hardouin J, Lesouhaitier O, Vila J, Kaplan JB, Jouenne T, De E. Characterisation of pellicles formed by *Acinetobacter baumannii* at the air-liquid interface. *PLoS One* 2014; 9: e111660; PMID:25360550; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0111660>
- [27] Álvarez-Fraga L, López M, Merino M, Rumbo-Feal S, Tomás M, Bou G, Poza M. Draft Genome Sequence of the Biofilm Hyperproducing *Acinetobacter baumannii* Clinical Strain MAR002. *Genome Announc* 2015; 3: e00824-15; PMID:26205868
- [28] Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJ. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc* 2015; 10:845–58; PMID:25950237; <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2015.053>
- [29] Puorger C, Vetsch M, Wider G, Glockshuber R. Structure, folding and stability of *FimA*, the main structural subunit of type 1 pili from uropathogenic *Escherichia coli* strains. *J Mol Biol* 2011; 412:520–35; PMID:21816158; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2011.07.044>
- [30] Hamad MA, Zajdowicz SL, Holmes RK, Voskuil MI. An allelic exchange system for compliant genetic manipulation of the select agents *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. *Gene* 2009; 430:123–31; PMID:19010402; <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2008.10.011>
- [31] Lee HW, Koh YM, Kim J, Lee JC, Lee YC, Seol SY, Cho DT, Kim J. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14:49–54; PMID:18005176; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01842.x>
- [32] Espinal P, Marti S, Vila J. Effect of biofilm formation on the survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *J Hosp Infect* 2012; 80:56–60; PMID:21975219; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2011.08.013>
- [33] Wroblewska MM, Sawicka-Grzelak A, Marchel H, Luczak M, Sivan A. Biofilm production by clinical strains of *Acinetobacter baumannii* isolated from patients hospitalized in two tertiary care hospitals. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008; 53:140–4; PMID:18400015; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695X.2008.00403.x>
- [34] Otto K, Silhavy TJ. Surface sensing and adhesion of *Escherichia coli* controlled by the Cpx-signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:2287–92; PMID:11830644; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.042521699>
- [35] Higgins PG, Janssen K, Fresen MM, Wisplinghoff H, Seifert H. Molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* bloodstream isolates obtained in the United States from 1995 to 2004 using rep-PCR and multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* 2012; 50:3493–500; PMID:22895032; <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01759-12>
- [36] Giannouli M, Antunes LC, Marchetti V, Triassi M, Visca P, Zarrilli R. Virulence-related traits of epidemic *Acinetobacter baumannii* strains belonging to the international clonal lineages I–III and to the emerging genotypes ST25 and ST78. *BMC Infect Dis* 2013; 13:282; PMID:23786621; <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-13-282>
- [37] Giles SK, Stroehrer UH, Eijkelkamp BA, Brown MH. Identification of genes essential for pellicle formation in *Acinetobacter baumannii*. *BMC Microbiol* 2015; 15:116; PMID:26047954; <http://dx.doi.org/10.1186/s12866-015-0440-6>
- [38] Brossard KA, Campagnari AA. The *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein plays a role in adherence to human epithelial cells. *Infect Immun* 2012; 80:228–33; PMID:22083703; <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.05913-11>
- [39] de Breij A, Gaddy J, van der Meer J, Koning R, Koster A, van den Broek P, Actis L, Nibbering P, Dijkshoorn L. *CsuA/BABCDE*-dependent pili are not involved in the adherence of *Acinetobacter baumannii* ATCC19606(T) to human airway epithelial cells and their inflammatory response. *Res Microbiol* 2009; 160:213–8; PMID:19530313; <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2009.01.002>
- [40] Harding CM, Tracy EN, Carruthers MD, Rather PN, Actis LA, Munson RS, Jr. *Acinetobacter baumannii* strain M2 produces type IV pili which play a role in natural transformation and twitching motility but not surface-associated motility. *MBio* 2013; 4:e00360-13; PMID:23919995; <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.00360-13>
- [41] Rumbo C, Gato E, Lopez M, Ruiz de Alegria C, Fernandez-Cuenca F, Martinez-Martinez L, Vila J, Pachon J, Cisneros JM, Rodriguez-Bano J, et al. Contribution of efflux pumps, porins, and  $\beta$ -lactamases to multidrug resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57:5247–57; PMID:23939894; <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00730-13>
- [42] Darling AC, Mau B, Blattner FR, Perna NT. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Res* 2004; 14:1394–403; PMID:15231754; <http://dx.doi.org/10.1101/gr.2289704>
- [43] Jones P, Binns D, Chang HY, Fraser M, Li W, McAnulla C, McWilliam H, Maslen J, Mitchell A, Nuka G, et al. InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics* 2014; 30:1236–40; PMID:24451626; <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btu031>
- [44] Hunger M, Schmucker R, Kishan V, Hillen W. Analysis and nucleotide sequence of an origin of DNA replication in *Acinetobacter calcoaceticus* and its use for *Escherichia coli* shuttle plasmids. *Gene* 1990; 87:45–51; PMID:2185139; [http://dx.doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90494-C](http://dx.doi.org/10.1016/0378-1119(90)90494-C)
- [45] Beceiro A, Moreno A, Fernandez N, Vallejo JA, Aranda J, Adler B, Harper M, Boyce JD, Bou G. Biological cost of different mechanisms of colistin resistance and their impact on virulence in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58:518–26; PMID:24189257; <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01597-13>



## Material suplementario

**Table S1.** Oligonucleotides and probes used in the present work.

Primer/Probe name	Sequence	Use in the present study
11085UPFw	cccctgcagtggggatcttgctcctgttcatt	Construction of the $\Delta$ 11085 strain
11085UPRv	ggggaattccccaagtgcaggtagctatggt	Construction of the $\Delta$ 11085 strain
11085DOWNFw	ggggaattcccctaaccgtcaaggtgcctgtt	Construction of the $\Delta$ 11085 strain
11085DOWNRv	gggggatccccctgaatatctaactcagcatc	Construction of the $\Delta$ 11085 strain
11085intUPFw	taaccgcaatttcatccgta	Confirmation the deletion of the LH92_11085 (LH92_RS10920) gene
11085intDOWNRv	ttgcagcctaaagtgaatc	Confirmation the deletion of the LH92_11085 (LH92_RS10920) gene
11085Fw	taactgtctggacattacc	Confirmation the deletion of the LH92_11085 (LH92_RS10920) gene
11085Rv	ctactggtacgacagctaat	Confirmation the deletion of the LH92_11085 (LH92_RS10920) gene
pMo130 site2 Fw	attcatgaccgtgctgac	Confirmation the construction of the $\Delta$ 11085 strain
pMo130 site2 Rv	cttgtctgtaagcggatg	Confirmation the construction of the $\Delta$ 11085 strain

# Capítulos

---

11085 <i>EcoRV</i> Fw	cccgatatcgggcaacaatttaagtataaaag	Cloning the LH92_11085 (LH92_RS10920) gene into the pWH1266 plasmid to complement the $\Delta$ 11085 strain
11085 <i>Bam</i> HI <i>Rv</i>	gggggatcccccttttaaagggctaactatat	Cloning the LH92_11085 (LH92_RS10920) gene into the pWH1266 plasmid to complement the $\Delta$ 11085 strain
pWH1266Fw	taggcttggttatgccgta	Confirmation the complementation of the $\Delta$ 11085 strain
pWH1266Rv	aaggagctgactgggtgaa	Confirmation the complementation of the $\Delta$ 11085 strain
LH92_03275RTFw	acagaaacagctccaactgaaa	qRT-PCR
LH92_03275RTRv	acatttgacagtaattgtcctaaaga	qRT-PCR
LH92_03275 Probe	ctctggct	qRT-PCR
LH92_03820RTFw	ttgcaattgataccgatgct	qRT-PCR
LH92_03820RTRv	ccccatcgtgacagctaaat	qRT-PCR
LH92_03820 Probe	tggtggaa	qRT-PCR
LH92_07655RTFw	gcttgactacaattctgatacttcaa	qRT-PCR
LH92_07655RTRv	ccaactccgcttcgcttagt	qRT-PCR
LH92_07655 Probe	gctgctga	qRT-PCR
LH92_07670RTFw	ctgaatattatgcaactggagca	qRT-PCR
LH92_07670RTRv	tcgtgtatttcacttgtagcgtt	qRT-PCR
LH92_07670 Probe	cagcaggt	qRT-PCR
LH92_08970RTFw	agttctggattcaccacagttg	qRT-PCR
LH92_08970RTRv	cacttggtcgaacaacgaca	qRT-PCR
LH92_08970 Probe	tggtctgtg	qRT-PCR
LH92_08985RTFw	ttgtaggattgcgaatgct	qRT-PCR
LH92_08985RTRv	cacaagtttctgtaactaaacct	qRT-PCR

---

LH92_08985 Probe	gctgctga	qRT-PCR
LH92_11070RTFw	ccacaggagggtgtaaccaatg	qRT-PCR
LH92_11070RTRv	ggcgctacctgtaccagttt	qRT-PCR
LH92_11070 Probe	aggtaggag	qRT-PCR
LH92_11075RTFw	caccctcatagccaaccact	qRT-PCR
LH92_11075RTRv	taccggggtatagcgttcaa	qRT-PCR
LH92_11075 Probe	tgctgtcc	qRT-PCR
LH92_11080RTFw	aatcgcatctttattcactacgaa	qRT-PCR
LH92_11080RTRv	ccgcaaagtttagtcaaggtgt	qRT-PCR
LH92_11080 Probe	tgatgagc	qRT-PCR
LH92_11085RTFw	tgttacacaacaccctaattgga	qRT-PCR
LH92_11085RTRv	ggctggtaatgtagacgcagacc	qRT-PCR
LH92_11085 Probe	accaccag	qRT-PCR
LH92_16105RTFw	ccaaagcttttagttgttggtca	qRT-PCR
LH92_16105RTRv	aagctccgtccataccatga	qRT-PCR
LH92_16105 Probe	cagctccc	qRT-PCR
LH92_16175RTFw	gggggattgcctgactctac	qRT-PCR
LH92_16175RTRv	caagcccattgaatttgagc	qRT-PCR
LH92_16175 Probe	ctccacca	qRT-PCR
A1S_2091RTFw	ggctggtaatgtagacgcaga	qRT-PCR
A1S_2091RTRv	tgttacacaacaccctaattgga	qRT-PCR
A1S_2091 Probe	accaccag	qRT-PCR
gyrBRTFw	tctctagtcaggaagtgggtacatt	qRT-PCR
gyrBRTRv	ggttatattcttcacggccaat	qRT-PCR
gyrB Probe	tggtctgtg	qRT-PCR
LH92_11065-11070Fw	ccactttactgagcaaagg	Characterization of the operon
LH92_11065-11070Rv	ttcaggtggagtctcaaaaa	Characterization of the operon
LH92_11070-11075Fw	caagtaattgttctctgaaag	Characterization of the operon

---

# Capítulos

---

LH92_11070- 11075Rv	tgtttaggttatcgccaa	Characterization of the operon
LH92_11075- 11080Fw	atcttgcttacggctact	Characterization of the operon
LH92_11075- 11080Rv	gataatagtcaaaaaacac	Characterization of the operon
LH92_11080- 11085Fw	ctgtaaatcggctacttcat	Characterization of the operon
LH92_11080- 11085Rv	ccatggactttatcatttga	Characterization of the operon
LH92_11085- 11090Fw	accagtagctgaggtattc	Characterization of the operon
LH92_11085- 11090Rv	agtatgctgagcgtttaataa	Characterization of the operon
GyrBFw	taaacttgctgtagtcttt	Characterization of the operon
GyrBRv	gcacattcgtacattgttat	Characterization of the operon

---

### **Capítulo III. Implicación del gen *feoA* en la patogénesis de *A. baumannii*.**

#### **Resumen**

El hierro libre es un nutriente muy limitado dentro de los huéspedes ya que el 80% del hierro se encuentra formando parte del grupo hemo y el que queda libre no es suficiente para suplir los requerimientos de las bacterias (148). Un suministro suficiente de este metal está relacionado con la proliferación, virulencia y persistencia del patógeno (150). Debido a esto, los sistemas de captación de hierro son importantes factores de virulencia de muchos microorganismos.

En el presente capítulo se describe el trabajo recogido en la publicación Álvarez-Fraga L, Vázquez-Ucha JC, Martínez-Gutián M, Vallejo JA, Bou G, Beceiro A & Poza M (2018) Pneumonia infection in mice reveals the involvement of the *feoA* gene in the pathogenesis of *Acinetobacter baumannii*, Virulence, DOI: 10.1080/21505594.2017.1420451 que se anexa a continuación.

Para identificar los genes implicados en el desarrollo de un proceso de neumonía, se obtuvieron los perfiles de expresión génica de la cepa de *A. baumannii* ATCC 17978 causando neumonía de ratón y se compararon con los perfiles de expresión génica de bacterias cultivadas en un matraz con medio de cultivo en el laboratorio.

El resultado de la transcriptómica comparativa reveló un conjunto de genes diferencialmente expresados. Entre ellos, destacó el gen A1S\_0242 (*feoA*) por encontrarse sobreexpresado 2.67 veces más durante el proceso de neumonía en comparación las bacterias cultivadas en matraz. Este gen resultó formar parte de un operón policistrónico que codificaba un sistema de captación de hierro denominado sistema Feo.

## Capítulos

---

El siguiente objetivo consistió en el estudio de la implicación del gen *feoA* en el fenotipo de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978 y, en particular, de su papel en virulencia.

La delección del gen *feoA* del genoma de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978 originó un incremento de la susceptibilidad de esta bacteria al estrés oxidativo y un descenso de la capacidad de formación de *biofilm*, de la adherencia a células epiteliales humanas y de la eficacia biológica.

Para investigar el papel del gen *feoA* durante una infección *in vivo*, se realizaron experimentos de modelos animales de infección en *Galleria mellonella* y neumonía en ratón. Ambos modelos mostraron que la virulencia del mutante isogénico  $\Delta 0242$  estaba significativamente atenuada comparada con la cepa ATCC 17978 salvaje.

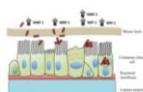
Los datos presentados en este trabajo mostraron que el gen A1S\_0242 (*feoA*) de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978 juega un papel importante en la capacidad de formación de *biofilm*, la adherencia a células epiteliales humanas, la eficacia biológica y, sobre, todo en la virulencia.



## Artículo



Virulence



ISSN: 2150-5594 (Print) 2150-5608 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/kvir20>

## Pneumonia infection in mice reveals the involvement of the *feoA* gene in the pathogenesis of *Acinetobacter baumannii*.

Laura Álvarez-Fraga, Juan C. Vázquez-Ucha, Marta Martínez-Gutián, Juan A. Vallejo, Germán Bou, Alejandro Beceiro & Margarita Poza

To cite this article: Laura Álvarez-Fraga, Juan C. Vázquez-Ucha, Marta Martínez-Gutián, Juan A. Vallejo, Germán Bou, Alejandro Beceiro & Margarita Poza (2018): Pneumonia infection in mice reveals the involvement of the *feoA* gene in the pathogenesis of *Acinetobacter baumannii*, *Virulence*, DOI: [10.1080/21505594.2017.1420451](https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1420451)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1420451>



© 2017 Taylor & Francis



Accepted author version posted online: 15 Jan 2018.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 1



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at <http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=kvir20>



**Pneumonia infection in mice reveals the involvement of the *feoA* gene in the pathogenesis of *Acinetobacter baumannii*.**

Laura Álvarez-Fraga<sup>#</sup>, Juan C. Vázquez-Ucha<sup>#</sup>, Marta Martínez-Gutián<sup>#</sup>, Juan A. Vallejo, Germán Bou, Alejandro Beceiro\* and Margarita Poza\*.

Servicio de Microbiología, Instituto de Investigación Biomédica (INIBIC), Complejo Hospitalario Universitario (CHUAC), Universidad da Coruña (UDC) A Coruña, Spain.

# Authors contributed equally to this work.

\* Both authors contributed equally for corresponding:

Alejandro.Beceiro.Casas@sergas.es (Alejandro Beceiro)

Margarita.Poza.Dominguez@sergas.es (Margarita Poza)

**KEYWORDS:** *Acinetobacter baumannii*, iron uptake, virulence, animal infection models

**RUNNING TITLE:** The *feoA* gene of *A. baumannii*

## ABSTRACT

*Acinetobacter baumannii* has emerged in the last decade as an important nosocomial pathogen. To identify genes involved in the course of a pneumonia infection, gene expression profiles were obtained from *A. baumannii* ATCC 17978 grown in mouse infected lungs and in culture medium. Gene expression analysis allowed us to determine a gene, the A1S\_0242 gene (*feoA*), over-expressed during the pneumonia infection. In the present work, we evaluate the role of this gene, involved in iron uptake. The inactivation of the A1S\_0242 gene resulted in an increase susceptibility to oxidative stress and a decrease in biofilm formation, in adherence to A549 cells and in fitness. In addition, infection of *G. mellonella* and pneumonia in mice showed that the virulence of the  $\Delta$ 0242 mutant was significantly attenuated. Data presented in this work indicated that the A1S\_0242 gene from *A. baumannii* ATCC 17978 strain plays a role in fitness, adhesion, biofilm formation, growth, and, definitively, in virulence. Taken together, these observations show the implication of the *feoA* gene plays in the pathogenesis of *A. baumannii* and highlight its value as a potential therapeutic target.

## INTRODUCTION

*Acinetobacter baumannii* is a Gram negative, non-fermentative, and non-flagellated bacillus. Although it is a normal inhabitant of human skin, intestinal tract and respiratory system, it is currently considered one of the most dangerous opportunistic pathogens. Recently, the World Health Organization included *A. baumannii* in a list of the most important antibiotic resistant pathogens <sup>1</sup>. This bacterium exhibits an excellent ability to develop antibiotic resistance which often results in strains resistant to several antimicrobial families <sup>2, 3</sup>. Carbapenems are broadly used to treat *A. baumannii* multiresistant strains; however, resistance to these antimicrobials increased dangerously in the last decade <sup>4</sup>. Similarly, an increment of resistance rates is emerging in the case of last resort antimicrobials such as colistin <sup>5</sup> or tigecycline <sup>6</sup>. Resistance to these antimicrobials has also appeared which lead us to the urgent need to design and evaluate new antimicrobial therapies. In the last decades, the number of hospital outbreaks caused by *A. baumannii* has increased noticeably, partly due to its multidrug resistance profile <sup>2, 7-10</sup>. Although the clinical importance of *A. baumannii* infections has increased, the pathogenicity of this microorganism is sparsely understood. Clinical *A. baumannii* strains exhibit remarkably variations in virulence-associated phenotypes such as motility, adherence, biofilm formation, invasion, iron uptake or cell capsule development among others <sup>11, 12</sup>. Some studies have shown that *Acinetobacter* species may reach the human skin and mucosal membranes and then colonize and persist on the host several weeks <sup>13</sup>. Bacterial adherence constitutes an essential step in the colonization process. The ability of the AbH12O-A2 strain, which caused the largest outbreak of *A. baumannii* known worldwide <sup>14-19</sup>, to adhere to human cells was one of the main factors involved in its persistence <sup>14</sup>. After adhesion, bacteria may form biofilms that are involved in the persistence of this pathogen in the hospital environment. Some components, such as the staphylococcal biofilm-associated protein (Bap), the CsuA/BABCDE usher-chaperone system or the poly-beta-1-6-N-acetylglucosamine have been described as involved in the *A. baumannii* biofilm formation and adherence phenotypes <sup>20-24</sup>. The outer membrane protein OmpA plays a role in biofilm formation on

# Capítulos

---

abiotic surfaces and has been shown to promote the adherence to eukaryotic host and invasion <sup>25</sup>.

Iron is essential for growth in most bacteria due to its redox activity and its role in many vital metabolic reactions, being a cofactor for many bacterial enzymes. Therefore, iron is necessary for bacteria to infect and multiply in tissues and body fluids of the host, playing a relevant role in pathogenesis <sup>26</sup>. Under in vivo conditions, iron is not readily available due to cells uptake or sequestration by proteins such as transferrin or lactoferrin, which are components of the innate immunity system that provide defense against pathogens <sup>27, 28</sup>. Bacteria encode multiple iron uptake pathways, which provide specificities and affinities for various forms of environmental or host iron. Under iron-limited conditions many invading bacteria respond by producing specific iron chelators, such as siderophores, that remove the iron from the host sources <sup>29-31</sup>. In addition, many bacteria, such as *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni* or *Legionella pneumophila*, take up soluble ferrous iron via the Feo system <sup>32-40</sup>, which is proposed to be the major ferrous iron transport system known in prokaryotes <sup>41</sup>. The Feo system was first identified in *E. coli* <sup>42, 43</sup> and it is encoded by the *feoABC* operon. FeoB, a bacterial ferrous iron transporter, is composed of a hydrophilic cytoplasmic domain and an integral membrane domain <sup>44, 45</sup>. The C-terminal membrane domain of FeoB is responsible for the formation of a pore in the membrane and the N-terminal contains a GTP-binding domain that regulates the transport activity. The roles of *feoA* and *feoC* remain unknown although *feoC* is predicted to encode for a transcriptional repressor of *feoAB* <sup>32, 43, 45</sup>. In pathogenic bacteria such as *E. coli*, *H. pylori* or *L. pneumophila*, mutations in the *feoB* gene have been shown to cause deficiency in ferrous iron uptake and virulence <sup>26, 33, 37-39</sup>, including assays emulating conditions encountered during infection of a mammalian host <sup>46</sup>. High-throughput sequencing technologies demonstrated the presence of the Feo system in 50 clinical strains of *A. baumannii* <sup>47</sup>.

In the present work, we identified a gene over-expressed during the course of the lung infection of *A. baumannii* in mice, the A1S\_0242 gene (*feoA*). We evaluated the role of this gene in fitness, biofilm production, attachment to biotic surfaces, resistance to

oxidative stress, and, finally, in the pathogenesis of *A. baumannii* using *Galleria mellonella* and murine pneumonia models.

## RESULTS

### *Genetic context of the feoA gene*

Transcriptomic analysis revealed a collection of genes differentially expressed in the *A. baumannii* lung infection model. Raw data have been deposited in the GEO database under the accession code GSE100552. Between them, the A1S\_0242 (*feoA*) gene was over-expressed in bacteria over the course of the lung infection compared to bacteria grown in LB media, as shown by Illumina (2.67-fold more  $\pm$  0.75) and qRT-PCR (6.34-fold more  $\pm$  2.03) analysis.

The genetic context of this gene was studied. The *feoA* gene, previously annotated in the ATCC 17978 genome (CP018664.1) as a putative ferrous iron transporter protein A containing a *feoA* domain, was found as part of a single operon comprising genes A1S\_0242, A1S\_0243 and A1S\_0244, as assessed by RNA reverse transcription (Figure 1). The A1S\_0243 gene was annotated in the ATCC 17978 genome (CP018664.1) as a ferrous transport protein B harboring a *feoB* domain. The A1S\_0244 gene was found as a hypothetical protein, with no conserved domains. Real time RT-PCR assays confirmed that both A1S\_0243 and A1S\_0244 surrounding genes were over-expressed during the lung infection (1.95-fold more  $\pm$  0.36 and 2.78-fold more  $\pm$  0.96, respectively) compared with genes from bacteria grown in LB-flasks.

Moreover, two homologues to the A1S\_0242 gene were found in the *A. baumannii* ATCC 17978 genome (CP018664.1). These genes were A1S\_3850 and A1S\_0652 that showed 53% and 54% of identity with the *feoA* gene, respectively. The A1S\_3850 gene, previously annotated in the ATCC 17978 genome as a hypothetical protein, is part of a single operon comprising genes A1S\_2929, A1S\_3850 and A1S\_2930 (data not shown). The A1S\_2929 and the A1S\_2930 genes were annotated as a putative

# Capítulos

---

cation efflux system protein and a putative ferrous iron transport protein B containing a *feoB* domain, respectively. The A1S\_0652 gene was annotated as a putative ferrous iron transport protein A containing a *feoA* domain followed by the A1S\_0653 gene encoding a putative ferrous iron transport protein B. Deeper bioinformatic analysis revealed that the A1S\_0652 gene was located in the plasmid pAB3 (GenBank accession number CP012005) of the *A. baumannii* ATCC 17978-mff strain (CP012004.1) while the A1S\_3850 was found in the chromosome.

All the publicly available complete genomes of *A. baumannii* were analyzed in order to find the A1S\_0242 and the A1S\_3850 genes. The A1S\_0242 gene was found in the 100 % of the 76 *A. baumannii* complete genomes analyzed, while the A1S\_3850 gene was located in the 14.5 % of them. Similarly, in species such as *A. pittii*, *A. nosocomialis*, *A. soli* or *A. calcoaceticus*, the A1S\_3850 gene was occasionally found while the A1S\_0242 gene was present in all the analyzed genomes.

The discovery of these two A1S\_0242 homologues induced us to investigate possible interactions between those three genes, being the A1S\_0242 gene the main objective of our work. Gene knockout mutants of the ATCC 17978 strain lacking the A1S\_0242 and A1S\_3850 genes were constructed in order to analyze their interaction. Therefore, the isogenic mutant derivatives  $\Delta$ 0242 and  $\Delta$ 3850 strains as well as the double mutant  $\Delta$ 0242/ $\Delta$ 3850 strain were obtained. Due to the plasmid location of the A1S\_0652 gene, it was not possible to perform a knockout mutant lacking this gene.

The complementation of the A1S\_0242 gene with the parental allele ( $\Delta$ 0242 complemented) was performed through the over-expression of the gene cloned into the pWH1266-Km vector. Data from qRT-PCR analysis revealed that indeed the A1S\_0242 was highly over-expressed under the control of the tetracycline promoter compared to its expression in the wild type gene (Table S1). As expected, the  $\Delta$ 0242 strain, as well as the  $\Delta$ 0242 strain harboring the empty pWH1266-Km vector ( $\Delta$ 0242 + pWH1266-Km), revealed no expression of the A1S\_0242 gene. Table S1 also shows that there is no expression of the A1S\_3850 gene in the  $\Delta$ 3850 strain and the over-expression of the A1S\_3850 gene from the plasmid was confirmed.



Also qRT-PCR analyses were performed in order to investigate the effects of the lack of the A1S\_0242 gene on the expression of its homologue genes. Data revealed that when the A1S\_0242 gene was absent, the A1S\_3850 and the A1S\_0652 genes maintained their expression levels (Table 1). Also, the deletion of the A1S\_3850 did not vary the expression of the A1S\_0242 gene whereas the expression of the A1S\_0652 gene increased. In addition, the deletion of both A1S\_0242 and A1S\_3850 genes revealed a minimal increase in the A1S\_0652 expression level, due to the effect of the A1S\_3850 gene.

Next, the abilities of the  $\Delta$ 0242 strain and its isogenic derivative mutants were tested under *in vitro* and *in vivo* conditions to confirm the role of this gene in fitness and virulence. The A1S\_3850 mutants were also included in some assays in order to discard its relevance in the pathogenesis of the ATCC 17978 strain.

### *Effects of the feoA gene deletion and vector loading on fitness*

To determine whether the deletion of genes A1S\_0242 and A1S\_3850 affect the bacterial growth rate, growth curve rates were measured in iron-sufficient and iron-restricted media. Determination of the growth rate constant ( $\mu$ ) gives a measure of fitness or replication ability<sup>48</sup>. The growth rates of the  $\Delta$ 0242 mutant did not show significant differences compared to the wild type strain in presence of iron (Figure 2). However, when the metal chelator 2,2'-bipyridil (BIP) was added to the medium, the mean generation of the  $\Delta$ 0242 mutant was higher (65 min,  $\mu=0.0105 \pm 0.0003$ ) with respect to the ATCC 17978 strain (45 min,  $\mu= 0.015 \pm 0.0012$ ), showing significant differences in fitness ( $p > 0.05$ ). In contrast, the deletion of A1S\_3850 did not show inhibition of growth compared with the ATCC 17978 parental strain. In agreement with these results, the double mutant  $\Delta$ 0242/ $\Delta$ 3850 showed a growth rate similar to the single mutant  $\Delta$ 0242 in BIP presence (Figure 2).

Studies of bacterial growth performed with the ATCC 17978 derivative strains carrying the pWH1266-Km vector showed that this plasmid load represents a very

relevant biological cost, as shown in Figure S1. These means that all the strains carrying the pWH1266-Km vector showed a significantly lower fitness than the wild type strain. For this reason, complemented strains were not included in assays where the growth rate was limiting.

## *The feoA gene deletion reduces biofilm formation and attachment to eukaryotic cells abilities*

The biofilm formation ability was evaluated and the  $\Delta 0242$  mutant derivative strain showed a significant decrease (*ca.* 2.15-fold less,  $p = 0.0034$ ) with respect to the ATCC 17978 parental strain (Figure 3). Complementation of the strain with the parental allele partially restored the biofilm formation phenotype. Deletion of the A1S\_3850 revealed no significant differences in biofilm formation with respect to the wild type strain. Biofilm formation was similar for the single  $\Delta 0242$  and the double mutant  $\Delta 0242/\Delta 3850$  strains.

As shown in Figure 4, the inactivation of the A1S\_0242 gene led to a reduction in the ability of the *A. baumannii* strain ATCC 17978 to adhere to human alveolar epithelial cells A549 (*ca.* 4-fold,  $P$  value  $< 0.0001$ ). In this case, the fitness of the strains was a limiting factor as can be seen in Figure S2, the wild type strain harboring the plasmid (ATCC 17978 + pWH1266-Km) showed an important decrease in biofilm formation ability, compared with the wild type strain (ATCC 17978). The complemented strain ( $\Delta 0242$  complemented) partially restored the wild type phenotype loading plasmid (ATCC 17978 + pWH1266-Km), as reflected in Figure S2. As shown in Figure S1, all strains harboring the pWH1266-Km vector resulted in an increase in the lag time and in a lower optical density at the end of growth curve analysis, which indicates a fitness decrease caused by the plasmid metabolic load. Besides, the  $\Delta 3850$  strain showed no significant differences with respect to the wild type and the double mutant strain showed similar attachment abilities as the  $\Delta 0242$  strain (Figure 4). No invasiveness was detected at 24 h in all cases (data not shown).

### *Effects of the feoA gene inactivation on susceptibility to oxidative stress*

When strains were subjected to reaction oxygen species (ROS) by the addition of paraquat in the presence of 100  $\mu$ M of the iron chelator 2,2'-bipyridyl (BIP), the  $\Delta$ 0242 mutant strain showed a MIC to paraquat of 8 mg/L, while the wild type strain ATCC 17978 showed a value of 32 mg/L, which indicates a significant increase in susceptibility to oxidative stress of the mutant strain with respect to the wild type strain (Table 3). No differences were found in the susceptibility to paraquat between the  $\Delta$ 0242 mutant and the  $\Delta$ 0242/ $\Delta$ 3850 double mutant (MIC of 8 mg/L). In concordance, the  $\Delta$ 3850 mutant neither showed significant differences with respect to the wild type strain (MIC of 32 mg/L). A slightly higher susceptibility to paraquat in the  $\Delta$ 0242 mutant was also observed in the medium without limitation of metal availability. Besides, when the strains carried the plasmid pHW1266-Km, the susceptibility to paraquat increased in all cases, due to the fitness loss as explained above (Figure S1). In Table 3 it can be observed that, even taking into account this global increased of susceptibility to paraquat in strains carrying the plasmid, the phenotype of higher susceptibility to oxidative stress in the presence of BIP of the  $\Delta$ 0242 mutant strain carrying the plasmid ( $\Delta$ 0242+pWH1266-Km, MIC of 1 mg/L) was restored in the complemented strain, this showing the same MIC to paraquat as the wild type strain carrying the pWH1266-Km vector (MIC of 4 mg/L).

### *The feoA gene is involved in virulence*

In order to explore the role of the *feoA* gene during the course of the in vivo infection, experimental animal models were performed in *G. mellonella* and mice.

The *A. baumannii* ATCC 17978 and the  $\Delta$ 0242,  $\Delta$ 3850 and  $\Delta$ 0242/ $\Delta$ 3850 derivative mutant strains were tested in the *G. mellonella* infection model. The survival assays (Figure 5) showed that the  $\Delta$ 0242 and  $\Delta$ 0242/ $\Delta$ 3850 mutant strains were significantly

## Capítulos

---

affected in their ability to infect and kill the caterpillars compared with the wild type strain ( $p < 0.05$ ).

These results were in agreement with the mortality rates of *G. mellonella* infected with different inocula of the *A. baumannii* strains (Table 4). Briefly, lethal doses (LD) of the ATCC 17978 strain were similar to those showed by the mutant  $\Delta 3850$ . Besides, the lethal doses of the mutant  $\Delta 0242$  were similar to those found in the  $\Delta 0242/\Delta 3850$  mutant strain. The inactivation of the gene A1S\_3850 did not affected the virulence ability of the ATCC 17978 strain using this *G. mellonella* infection model. The LD<sub>50</sub> of the ATCC 17978 strain and the  $\Delta 3850$  mutant was approximately 5-fold lower than that of the  $\Delta 0242$  and  $\Delta 0242/\Delta 3850$  mutant strains at 24 h, and 3.5-fold lower at 144 h. The LD<sub>100</sub> of the ATCC 17978 strain and the  $\Delta 3850$  mutant was approximately 4-fold lower than that of the  $\Delta 0242$  and  $\Delta 0242/\Delta 3850$  mutant strains at 24 h, and 3-fold lower at 144 h.

The virulence of the ATCC 17978 and  $\Delta 0242$  strains was also assessed using a murine pneumonia model by measuring survival time of infected mice. Two groups of 10 mice were intratracheally infected with  $5.5 \times 10^7$  CFUs/mouse, which means a LD<sub>90</sub> of the wild type strain. However, the same dose of the  $\Delta 0242$  mutant derivative strain produced only 30 % of mortality (Figure 6A). Thus, a significant decrease in virulence using a mouse pneumonia model was observed when the gene A1S\_0242 was deleted ( $p < 0.01$ ).

A second model was also performed using an experimental pneumonia model in mice in order to determine the bacterial load in lungs and the frequency of sterile blood cultures (Table 5 and Figure 6B). Data revealed that, in groups inoculated with the ATCC 17978 strain, the bacterial load was approximately 1 log higher than in mice inoculated with the  $\Delta 0242$  mutant strain ( $p < 0.01$ ). Besides, the frequency of sterile blood cultures increased up to 75% in the group inoculated with the  $\Delta 0242$  mutant strain compared with the mice inoculated with the ATCC 17978 strain (8.4%), ( $p < 0.01$ ). Similarly, the survival time was significantly higher in the group of mice inoculated with the  $\Delta 0242$  mutant strain than in the mice harboring the wild type strain ( $p < 0.01$ ).

## DISCUSSION

The success of lung infection partly depends on the ability of bacteria to acquire iron, a cofactor needed for many enzymatic reactions. Iron is essential for vital functions of bacteria and its presence in the host environment is restricted. This iron restriction constitutes an immune defense mechanism. *A. baumannii* is able to grow under iron-limiting conditions such as those occurred during human infection, however there is scarce information about the iron uptake of this microorganism during the course of the infection. Different studies showed that *A. baumannii* produces siderophores<sup>49</sup> such as the iron chelating agent acinetobactin<sup>18, 31, 47</sup>, the fimsbactin A-F<sup>29</sup> or the baumanoferrin A and B<sup>30</sup> which are required for virulence. In addition, some outer membrane proteins such as OprD and OmpW have been related to iron uptake in *A. baumannii*<sup>50, 51</sup>. Recently, a study concerning the gene expression profile of *A. baumannii* revealed that most of the genes hyper-expressed during bacteremia were those involved in iron transport and uptake<sup>52</sup>.

At neutral pH and aerobic conditions, the ferric iron  $\text{Fe}^{3+}$  is insoluble. At this point, bacteria depend on siderophores for the iron uptake, such as acinetobactin, pyoverdine or enterobactin, previously described in *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *E. coli*, respectively<sup>53 54</sup>, as well as additional molecules with Fe-chelating ability, such as citrate in *P. aeruginosa*<sup>55</sup>. In contrast, in anaerobic conditions, ferrous iron  $\text{Fe}^{2+}$  is abundant and is captured through uptake systems<sup>56</sup>, such as the Feo system. However, a relevant link exists between the Feo system and the citrate-mediated  $\text{Fe}^{3+}$  acquisition of *P. aeruginosa*. The ferric iron  $\text{Fe}^{3+}$  chelated by citrate must be reduced to  $\text{Fe}^{2+}$  prior to its transport into the cytosol by the membrane transporter FeoB. A ferric citrate-specific cytoplasmic membrane transport component is absent in *P. aeruginosa*<sup>57, 58</sup>. Similar cooperation between the FeoB transporter and the citrate-promoted Fe acquisition has been suggested in other species, such as *H. pylori*<sup>37</sup> and *Leptospira biflexa*<sup>59</sup>. Genes encoding for the baumanoferrin biosynthetic gene cluster found in *A. baumannii*<sup>30</sup> showed to be homologous to components of the acinetoferrin system, a citrate-based

# Capítulos

---

siderophore described in *A. haemolyticus*<sup>60</sup>. However, similar relationships between these siderophores and the Feo system are yet unknown.

Transcriptome analysis of *A. baumannii* ATCC 17978 strain, using RNA isolated from BAL of the infected lungs as starting material, revealed that the A1S\_0242 gene (a ferrous iron transporter protein A) was over-expressed during the course of the pneumonia infection. Further analysis of the genome revealed the presence of other two genes (A1S\_3850 and A1S\_0652) homologues to A1S\_0242, both harboring a *feoA* domain. This motivated us to study the genetic context of those genes. Informatic analyses revealed the presence of the A1S\_0242 gene in all the complete *A. baumannii* genomes while the A1S\_3850 and the A1S\_0652 genes were rarely found.

The Feo systems found in *A. baumannii* ATCC 17978 contain in all cases genes similar to the previously described *feoA* and *feoB* genes but lacks the *feoC* gene found in other species. More functional studies related to the A1S\_0244 could explain if this gene could act as a *feoAB* repressor in *A. baumannii*. The presence of these three genes containing a *feoA* domain in the strain ATCC17978 triggered us to study the function of the A1S\_0242 (*feoA*) and its interaction with the other two homologue genes (A1S\_3850 y A1S\_0652). Real time procedures revealed that the lack of A1S\_0242 does not vary A1S\_0652 and A1S\_3850 expression while deletion of A1S\_3850 increased the A1S\_0652 expression.

In a previous work<sup>61</sup>, transcriptional profiles indicated that the A1S\_0242 and the A1S\_3850 genes expression remained unaltered in biofilm-associated cells when compared to the planktonic cells, while the A1S\_0652 gene increased. However, when the transcriptional profile of *A. baumannii* was determined during bacteremia<sup>52</sup>, it was recovered that the expression of A1S\_0650 and A1S\_3850 genes remained unaltered whereas the expression of the A1S\_0242 gene increased. Moreover, Eijkelkamp et al.<sup>62</sup> studied the transcriptional profiles of the genes of *A. baumannii* under iron limiting conditions. In this case, it was found that the A1S\_0242 and A1S\_0652 genes were up-regulated under iron limiting conditions while the A1S\_3850 gene did not showed any different expression profile.

In this study we report many evidences of the implication of the A1S\_0242 gene (*feoA*) in fitness and virulence of *A. baumannii* ATCC 17978. The importance of the *feoA* gene was first evidenced in fitness. The  $\Delta 0242$  mutant showed a lower growth rate than the wild-type strain in iron-limited conditions. In contrast the mutants  $\Delta 3850$  and  $\Delta 0242/\Delta 3850$  did not decreased in growth rates compared with the parental and  $\Delta 0242$  strains, respectively, thus minimizing the relevance of the A1S\_3850 gene present in the ATCC 17978 strain.

Significant differences were also found in biofilm production or cellular attachment. The deletion of *feoA* demonstrated that this gene was involved in those mechanisms used by *A. baumannii* to colonize and infect the host organs while deletion of the homologue gene A1S\_3850 did not show any changes. In agreement with previous results, the mutant  $\Delta 0242$  showed a higher susceptibility to oxidative stress than the wild-type strain. Superoxide dismutase plays a key role in metabolizing  $O_2^-$ , avoiding reactions that can cause damage and the formation of reactive oxygen species. This enzyme frequently uses Fe as metal cofactor to catalyze the detoxification of superoxide<sup>63</sup>. Therefore, the  $\Delta 0242$  mutant strain was more susceptible to the oxidative stress induced by paraquat probably due to decreased superoxide dismutase activity. The  $\Delta 3850$  and the double mutant  $\Delta 0242/\Delta 3850$  did not showed any effect on biofilm production, cellular attachment or oxidative stress, which once more highlights the important role of the A1S\_0242 gene in pathogenesis and indicates the irrelevant role of the A1S\_3850 gene in these processes.

Fitness is usually defined as the capacity for survival and reproduction in a particular environment<sup>64</sup>, and virulence is defined as the degree of pathogenicity (ability of an agent to cause disease). Most pathogens use of a combination of two properties to cause disease: (i) toxicity, the degree to which a substance causes harm, and (ii) invasiveness, the ability to penetrate into the host and spread<sup>48, 65</sup>. In the present study we have proved that fitness is reduced when the *feoA* gene (A1S\_0242) is inactivated under iron-limited conditions. Additionally, virulence decreased as judged by the reduced ability of the mutant  $\Delta 0242$  strain to attach to alveolar cells and the increased susceptibility to oxidative stress, which is one of the main antibacterial mechanisms

# Capítulos

---

during phagocytosis<sup>66</sup>, being all these processes implicated in the pathogenicity of *A. baumannii*. Data indicated that the increase of survival and lethal doses obtained in the *in vivo* models with the  $\Delta 0242$  mutant strain is probably due to a double effect or synergy between the fitness lost and the decrease of virulence, caused by a reduced ability to arrest iron from the environment.

Moreover, complementation experiments were performed in order to better demonstrate the role of *feoA* in virulence. Since the load of the pWH1266-Km vector decreases fitness (see Figure S1) not all assays could be performed with the complemented mutants. Accordingly, those assays in which fitness does not play a relevant role, such as biofilm production, were performed including the complemented strains. These assays clearly demonstrated that the complementation is possible and indeed restored the original phenotype. However, those assays where fitness is a limiting factor, such as the *in vivo* assays in animal models, were carried out without the complemented strains.

In a recent screening of genes involved in bacterial survival of *A. baumannii* using a mouse model of bloodstream infection, from a transposon mutant library comprising more than 100,000 mutants, 89 were selected for further studies<sup>46</sup>. Between them, two genes belonged to iron uptake systems, the *fepA* and the *feoB* genes, supporting the role of these systems in the *A. baumannii* pathogenesis<sup>46</sup>. However, no *in vivo* assays were performed on the study to confirm the results. In the present study, the implication of FeoA in the pathogenesis of *A. baumannii* was also evidenced using experimental *in vivo* infections that imply the host response. In the first model, previously validated to study *A. baumannii* infections in iron-defective conditions<sup>18, 67</sup>, caterpillars of *G. mellonella* were infected with the wild-type and mutant strains. Data indicated an impaired virulence showing a lower capacity to persist and kill the caterpillars in the case of the  $\Delta 0242$  strain but not in the case of the  $\Delta 3850$  strain, which shows again the lack of implication of the A1S\_3850 in pathogenesis. Similarly, in the pneumonia models of infection in mice, the mutant  $\Delta 2042$  strain with reduced iron transport functions was less virulent than the wild-type strain. Both assays with invertebrate and vertebrate hosts reflected similar effects. Taken together these observations indicate that the *feoA* gene



of *A. baumannii* is essential for the full virulence of this microorganism. However, virulence of *A. baumannii*, using the animal models here presented, was not entirely inhibited, suggesting that other iron transport systems previously described such as *fepA*, acinetobactin, baumanoferrin or fimsbactin<sup>29, 30, 46, 47</sup> are present in the ATCC 17978 strain and should be active when the Feo system is abolished.

In summary, data indicated that the A1S\_0242 gene (*feoA*) from *A. baumannii* ATCC 17978 strain, which is involved in iron uptake and that was found as over-expressed during the course of a pneumonia infection, plays a role in adhesion, biofilm formation and resistance to oxidative stress. Definitively, in the present study we demonstrated that the FeoA protein is needed for the full virulence phenotype of the strain ATCC 17978 of *A. baumannii* and that the FeoA-mediated acquisition of iron is essential for the *A. baumannii* pathogenesis.

## MATERIAL AND METHODS

### *Bacterial strains*

*A. baumannii* ATCC 17978 and its derivative strains and *E. coli* listed in Table 2 were routinely grown or maintained in Luria-Bertani (LB) or Mueller-Hinton (MH) media with 20 % agar added for plates for general purposes. All strains were grown at 37 °C and stored at -80 °C in LB broth containing 10 % glycerol. When appropriate, cultures were supplemented with kanamycin (Km) at a final concentration of 50 µg/mL (Sigma-Aldrich, #K1377).

### *Bacterial RNA extraction from murine pneumonia infection*

An experimental pneumonia model was used to describe the transcriptome of the ATCC 17978 strain during the course of the infection. BALB/c 9- to 11-week old male mice weighing 25 to 30 g were intratracheally inoculated with approximately  $5.5 \times 10^7$

# Capítulos

---

CFUs/mouse of exponentially grown cells of the ATCC 17978 strain into mice. The number of bacteria present in the inoculum was checked by plate counting in LB agar plates. Briefly, mice anesthetized with an oral suspension of sevoflurane (Zoetis, #NADA 141-103) were suspended by their incisors on a board in a semi-vertical position. The efficacy of the intratracheal inoculation was confirmed by using an endoscope on the oral cavity. The trachea was accessed using a blunt-tipped needle for the inoculation of a 40- $\mu$ L bacterial suspension made in sterile saline solution and 10 % porcine mucin (wt/vol) (Sigma) mixed at a 1:1 ratio. A solution of ketamine (500  $\mu$ g/mouse) (Pfizer, #47639/24/15) and medetomidine (15  $\mu$ g/mouse) (Domtor, #933ESP) was immediately intraperitoneally injected after inoculation in order to keep the mice at least 20 min in a 30° inclined position. Dead mice in the first 4 h after inoculation were not included in the final analyses. Mice were euthanized with an overdose of thiopental sodium (Sandoz, NDC0781-6160-43) 20 h after inoculation. Then, a bronchoalveolar lavage (BAL) was performed to obtain bacteria suitable for RNA extraction (*in vivo* samples). All mice were maintained in the specific pathogen-free facility at the Technology Training Center of the Hospital of A Coruña (CHUAC, Spain). All experiments were done with the approval of and in accordance with regulatory guidelines and standards set by the Animal Ethics Committee (CHUAC, Spain, project code P82), in accordance with the Helsinki Declaration of 1975. RNA extracted from bacteria grown in LB-flasks ( $OD_{600} = 1.0$ ) at 37°C and 180 rpm was used as experimental control (*in vitro* samples). Total RNA was immediately extracted from both samples using the RNeasy Mini Kit (Qiagen #74104), treated with DNase I (Invitrogen, # 18068015) and purified with RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen, #74204). Final concentrations and purity grades of the samples were determined using a BioDrop  $\mu$ LITE (Isogen Life Science) and a Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies Inc.).

## *Deep sequencing procedures*

To characterize the complete transcriptomes of the studied samples, mRNA libraries from *in vivo* and *in vitro* samples obtained as explained above were prepared following the Truseq RNA sample preparation protocols from Illumina Inc. at CIC

bioGUNE's genome analysis platform (Derio, Spain). Three biological replicates were studied for each sample.

### *Read processing and comparisons of gene expression profiles*

Fifty nucleotide reads from each mRNA library were obtained using HiScanSQ (Illumina Inc., CIC bioGUNE, Bilbao, Spain). Short reads were aligned against the complete genome of *A. baumannii* ATCC 17978 and plasmids pAB1 and pAB2 (GenBank accession codes: NC\_009085.1, NC\_009083.1 and NC\_009084.1, respectively). The genetic profiles comparison was done at CIC bioGUNE's genome analysis platform (Derio, Spain). Raw data were deposited in the GEO database under the accession code GSE100552.

### *Bioinformatic analysis*

Genome analyses were done using the basic local Alignment Search Tool of the NCBI (BLAST, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

### *Construction of isogenic deletion derivatives*

In the present work, we focused on the study of the A1S\_0242 gene. The  $\Delta$ 0242 isogenic deletion mutant derivative of the ATCC 17978 strain was constructed by deleting a region of the A1S\_0242 gene. The suicide vector pMo130 (Genbank: EU862243), was used as described before<sup>68</sup> where upstream and downstream regions flanking the A1S\_0242 gene were PCR-amplified and cloned into the pMo130 vector using primers listed in Table S2. The plasmid construction obtained was used to transform ATCC 17978 cells by electroporation<sup>61</sup>. Recombinant colonies representing the first crossover event were selected as previously described<sup>69</sup>. The second crossover event leading to gene knockout was confirmed by PCR using primers listed in Table S2 as described before<sup>68</sup>.

# Capítulos

---

The A1S\_3850 was found in the genome of the 17978 strain as an A1S\_0242 homologue. In order to study its interference with the A1S\_0242 gene as well as discard its relevance in pathogenesis, a  $\Delta$ 3850 isogenic deletion mutant of the ATCC 17978 strain was constructed following the protocol described above and using the primers listed in Table S2. In addition, a double isogenic mutant strain,  $\Delta$ 0242/ $\Delta$ 3850, was performed following the same protocol where the second deletion ( $\Delta$ 3850) was constructed over the  $\Delta$ 0242 mutant.

## *Complementation of the mutant strains*

The pWH1266-Km plasmid was constructed as previously described<sup>68</sup>. Then, in order to complement the  $\Delta$ 0242 strain, the A1S\_0242 gene was amplified from the genome of the ATCC 17978 strain using primers listed in Table S2 and then cloned into the *EcoRV* and *BamHI* restriction sites of the pWH1266-Km plasmid under the control of the tetracycline resistance gene promoter using the primers listed in Table S2. The resulting construction was used to transform  $\Delta$ 0242 mutant cells by electroporation. Transformants were selected on kanamycin-containing plates and checked by PCR using primers listed in Table S2. Moreover, ATCC 17978 and  $\Delta$ 0242 strains harboring the empty pWH1266-Km vector were used as experimental controls. Finally, the  $\Delta$ 3850 derivative strain was also complemented following the same procedure described above.

## *Retrotranscription and real-time RT-PCR assays*

Total RNA from ATCC 17978 strain and the isogenic mutants ( $OD_{600} = 1.0$ ) was isolated using the High Pure RNA Isolation Kit (Roche, #11828665001). RNA samples were treated with DNase I (Invitrogen, #18068015) and purified with GeneJET RNA Cleanup and Concentration Micro Kit (Thermo Fisher Scientific, #K0841).

In order to analyze the polycistronic nature of the A1S\_0242-0244 operon, the cDNA was obtained from RNA samples using the iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad,

#170-8890) following the manufacturer's recommendations. The cDNA from ATCC 17978 was amplified with the GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase (Promega, #M7808) using pairs of primers designed to anneal to the 3'-end of every gene and the 5'-end of the next one (Table S2). Genomic DNA and total RNA without reverse transcription were used as templates for positive and negative controls, respectively, and the amplicons were detected by standard 1% agarose gel electrophoresis. The *gyrB* gene was used as a positive control. All the assays were performed in triplicate.

Real-time reverse transcription-PCR (qRT-PCR) was carried out to determine the expression level of the genes of interest using UPL (Roche) and TaqMan (Applied Biosystems) probes and primers listed in Table S2. The LightCycler 480 RNA Master hydrolysis probes kit (Roche, #04991885001) and the LightCycler 480 RNA instrument (Roche) were used together and the following protocol was used: initial incubation of 65 °C, 3 min, followed by a denaturation step at 95 °C for 30 s, 45 cycles at 95 °C, 15 s and 60 °C, 45 s, and a final elongation step at 40 °C, 30 s. The expression level was standardized relative to the transcription level of the housekeeping gene *rpoB*. All the assays were performed in triplicate.

### *Growth curve analysis*

Fitness was assessed by measuring the growth rates of the ATCC 17978 strain and the mutant derivatives strains. Briefly, 1.5 ml of LB medium were inoculated with approximately  $5 \times 10^7$  CFU of each strain, previously grown until the stationary phase, and incubated at 37°C with constant shaking at 180 rpm. Assays were performed in MH medium (*normal conditions*) and in MH supplemented with 200 µM of 2,2'-bipyridyl (BIP, Sigma-Aldrich, #D216305) (*iron deficit conditions*). Growth was monitored using 24-well plates in an Epoch 2 Microplate Spectrophotometer (BioTek Instruments, Inc.) and OD<sub>600</sub> values were recorded every 10 min. At least three independent experiments were performed for each strain. The growth rate constant ( $\mu$ ) was calculated on the basis of the exponential segment of the growth curve and defined as  $\ln_2/g$ , where  $g$  is the

# Capítulos

---

doubling time or mean generation time. The results were compared using Student's *t* test.

## *Quantitative biofilm assay*

Biofilm formation was determined following the protocol previously described by Tomaras et al.<sup>23</sup> and modified by Alvarez-Fraga et al.<sup>68</sup>. Briefly, colonies of *A. baumannii* were grown on LB plates and used to inoculate LB broth. Overnight cultures were centrifuged and the pellet washed and resuspended in 5 mL of SB medium (0.5% NaCl and 1% tryptone). A 1:100 dilution of each sample was stagnant incubated at 37°C for 48 h. In order to evaluate the total cell biomass the growth was measured at OD<sub>600</sub>. Biofilm formation ability was analyzed by crystal violet staining followed by solubilisation with ethanol-acetone. In order to avoid variations due to differences in bacterial growth under different experimental conditions, the OD<sub>580</sub>/OD<sub>600</sub> ratio was used to normalize the amount of biofilm formed to the total cell content of each sample. Eight independent replicates were performed. Student's *t*-test was performed to evaluate the statistical significance of observed differences.

## *Adhesion to A549 human alveolar epithelial cells*

The ability of the isogenic *A. baumannii* strains ( $\Delta$ 0242,  $\Delta$ 3850 and the double mutant  $\Delta$ 0242/ $\Delta$ 3850) to adhere to A549 human epithelial cells was evaluated and compared to the wild type strain. Invasion and adhesion abilities were analyzed as previously described by Gaddy et al.<sup>25</sup> with some modifications<sup>68</sup>. Briefly, A549 human alveolar epithelial cells were grown at 37°C and 5 % CO<sub>2</sub> in DMEM medium (Sigma-Aldrich, #D5671) containing 10 % of fetal bovine serum (FBS) and 1 % of penicillin-streptomycin (Gibco, #15070063). Monolayers were washed with saline solution and HBSS (Hank's balanced salt solution, Gibco, #11520476) without glucose (mHBSS). After that, A549 cells were infected with 10<sup>7</sup> bacteria per well and incubated, 3 h for the

adherence determination, in mHBSS at 37 °C. To analyze the attachment ability of bacteria, A549 cells were washed with saline solution and lysed in 500 µL of 0.5 % sodium deoxycholate. Dilutions of the lysates were plated onto LB agar and incubated at 37 °C for 24 h. Colony forming units were counted to determine bacteria that had attached to or invaded A549 cells. Four independent replicates were done. T-student tests were performed to evaluate the statistical significance of the observed differences.

### *Determination of susceptibility to oxidative stress*

The susceptibility to oxidative stress of the ATCC 17978 strain type and the isogenic mutant derivative strains was determined by microdilution using paraquat (Sigma-Aldrich, #856177) to achieve oxidative stress conditions in order to obtain the Minimal Inhibitory Concentration (MIC), following the CLSI criteria <sup>70</sup>. Briefly, strains were grown in MH plates for 24 h at 37°C. Then, 150 µL of serial dilutions of MH medium containing paraquat were performed in 96-well plates in the presence (100 µM) or absence of the metal chelator 2,2- bipyridyl (BIP). Plates were then inoculated with 7.5 µL of a 0.5 McFarland cellular suspension containing approximately  $1 \times 10^7$  CFU/mL of bacteria. Bacterial growth on plates was studied after incubation at 37°C for 24 h.

### *Galleria mellonella virulence assay*

The virulence of the wild type strain and its derivative mutant strains was evaluated using a *Galleria mellonella* survival assay and a determination of the lethal doses (LD<sub>50</sub> and LD<sub>100</sub>). Caterpillars were obtained from Bio Systems Technology (Exeter, UK) and stored at 15 °C prior to use. *A. baumannii* cells previously grown for 24 h in LB broth were collected by centrifugation and resuspended in sterile phosphate-buffered saline (PBS). Appropriate bacterial inocula were determined spectrophotometrically at OD<sub>600</sub> and confirmed by plate counting using LB agar plates. Thus, *G. mellonella* survival assays were performed by injecting 10 µL-suspension containing approximately  $2 \times 10^4$

# Capítulos

---

CFU/larva in groups of 10 larvae as previously described <sup>71</sup>. Two control groups were included; not injected larvae (intact) and larvae injected with an equivalent volume of sterile PBS. The tested groups included larvae infected with ATCC 17978,  $\Delta 0242$ ,  $\Delta 3850$  and  $\Delta 0242/\Delta 3850$  strains. After injection, the larvae were incubated at 37°C in darkness, and death was assessed at 8 h intervals over 6 days. Caterpillars were considered dead and removed if they displayed no response to probing. The resulting survival curves were plotted using the Kaplan-Meier method <sup>72</sup> and analyzed using the log-rank (Mantel-Cox) test.

LD<sub>50</sub> and LD<sub>100</sub> were calculated using groups of 7 larvae of *G. mellonella* infected as described above. Larvae were infected with each strain with an inoculum of 10  $\mu$ L starting at  $8 \times 10^5$  CFUs/larvae, and then the inocula serially diluted at  $2 \times 10^5$ ,  $8 \times 10^4$ ,  $2.6 \times 10^4$ ,  $8 \times 10^3$  and  $2.6 \times 10^3$  CFUs/larvae. Control groups were also included. Lethal doses were obtained for 24 and 120 h post-infection. <sup>73</sup>

## *Murine pneumonia virulence assay*

The pneumonia model was used to evaluate the virulence ability of the ATCC 17978 and the isogenic mutant  $\Delta 0242$  strain using BALB/c male mice. The procedure followed was the above described for bacterial RNA extraction from the infection, with the exception of the euthanasia that occurred using an overdose of thiopental sodium 144 h after inoculation. Death was assessed at 8 h intervals. The survival curves were plotted using the Kaplan-Meier method <sup>72</sup> and analyzed using the log-rank (Mantel-Cox) test.

To ascertain the relevance of the *feoA* gene in virulence in mice pneumonia a second series of assays was performed to determine the effect of the inactivation of *feoA* on the bacterial load in lungs and presence of bacteria in blood. Groups of 12 mice were intratracheally inoculated as previously described with the ATCC 17978 and the mutant  $\Delta 0242$  strains. Mice were inoculated with approximately  $2 \times \text{LD}_{100}$  of the ATCC 17978 ( $12 \times 10^7$  CFUs/mouse) and observed for mortality over 72 h. All the animals were analyzed



immediately after death. Blood and lung samples were obtained and processed as previously described previously<sup>74</sup>. Student's t-test was performed to evaluate the statistical significance of differences.

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work has been funded by Projects PI15/00860 to GB, CP13/00226 to AB, PI11/01034 to MP and P14/00059 to MP and AB, all integrated in the National Plan for Scientific Research, Development and Technological Innovation 2013-2016 and funded by the ISCIII - General Subdirection of Assessment and Promotion of the Research-European Regional Development Fund (FEDER) "A way of making Europe". The study was also funded by the project IN607A 2016/22 (Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria) to G.B. Also supported by Planes Nacionales de I+D+i 2008-2011 / 2013-2016 and Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Economía y Competitividad, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015/0014 and REIPI RD16/0016/006) co-financed by European Development Regional Fund "A way to achieve Europe" and operative program Intelligent Growth 2014-2020. J. A. Vallejo was financially supported by the Sara Borrell Programme (ISCIII, Spain CD13/00373), J.C. Vázquez-Ucha was financially supported by the Miguel Servet Programme (ISCIII, Spain CP13/00226) and M. Martínez-Gutián was financially supported by the grant Clara Roy (Spanish Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases). We thank M. I. Voskuil (Dept. of Immunology and Microbiology, University of Colorado Medical School, CO, USA) for providing pMo130.

### **REFERENCES**

1. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery and development of new antibiotics. World Health Organization, 2017.

# Capítulos

---

2. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev 2008; 21:538-82.
3. Maragakis LL, Perl TM. *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. Clin Infect Dis 2008; 46:1254-63.
4. Gales AC, Jones RN, Sader HS. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006-09). J Antimicrob Chemother 2011; 66:2070-4.
5. Karaiskos I, Souli M, Galani I, Giamarellou H. Colistin: still a lifesaver for the 21st century? Expert Opin Drug Metab Toxicol 2017; 13:59-71.
6. Pournaras S, Koumaki V, Gennimata V, Kouskouni E, Tsakris A. In Vitro Activity of Tigecycline Against *Acinetobacter baumannii*: Global Epidemiology and Resistance Mechanisms. Adv Exp Med Biol 2016; 897:1-14.
7. Bou G, Cerveró G, Domínguez MA, Quereda C, Martínez-Beltrán J. PCR-based DNA fingerprinting (REP-PCR, AP-PCR) and pulsed-field gel electrophoresis characterization of a nosocomial outbreak caused by imipenem- and meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. Clin Microbiol Infect 2000; 6:635-43.
8. Higgins PG, Dammhayn C, Hackel M, Seifert H. Global spread of carbapenem-resistant. J Antimicrob Chemother 2010; 65:233-8.
9. Valencia R, Arroyo LA, Conde M, Aldana JM, Torres MJ, Fernández-Cuenca F, et al. Nosocomial outbreak of infection with pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care university hospital. Infect Control Hosp Epidemiol 2009; 30:257-63.
10. Corbella X, Montero A, Pujol M, Domínguez MA, Ayats J, Argerich MJ, et al. Emergence and rapid spread of carbapenem resistance during a large and sustained

hospital outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol 2000; 38:4086-95.

11. McConnell MJ, Actis L, Pachón J. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. FEMS Microbiol Rev 2013; 37:130-55.

12. Smani Y, Dominguez-Herrera J, Pachón J. Association of the outer membrane protein Omp33 with fitness and virulence of *Acinetobacter baumannii*. J Infect Dis 2013; 208:1561-70.

13. Lee JC, Koerten H, van den Broek P, Beekhuizen H, Wolterbeek R, van den Barselaar M, et al. Adherence of *Acinetobacter baumannii* strains to human bronchial epithelial cells. Res Microbiol 2006; 157:360-6.

14. Pérez A, Merino M, Rumbo-Feal S, Álvarez-Fraga L, Vallejo JA, Beceiro A, et al. The FhaB/FhaC two-partner secretion system is involved in adhesion of *Acinetobacter baumannii* AbH12O-A2 strain. Virulence 2016:1-16.

15. Méndez JA, Mateos J, Beceiro A, Lopez M, Tomás M, Poza M, et al. Quantitative proteomic analysis of host-pathogen interactions: a study of *Acinetobacter baumannii* responses to host airways. BMC Genomics 2015; 16:422.

16. Merino M, Alvarez-Fraga L, Gomez MJ, Aransay AM, Lavin JL, Chaves F, et al. Complete Genome Sequence of the Multiresistant *Acinetobacter baumannii* Strain AbH12O-A2, Isolated during a Large Outbreak in Spain. Genome announcements 2014; 2.

17. Acosta J, Merino M, Viedma E, Poza M, Sanz F, Otero JR, et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* Harboring OXA-24 carbapenemase, Spain. Emerg Infect Dis 2011; 17:1064-7.

18. Gaddy JA, Arivett BA, McConnell MJ, Lopez-Rojas R, Pachon J, Actis LA. Role of acinetobactin-mediated iron acquisition functions in the interaction of

# Capítulos

---

*Acinetobacter baumannii* strain ATCC 19606T with human lung epithelial cells, *Galleria mellonella* caterpillars, and mice. *Infection and immunity* 2012; 80:1015-24.

19. Mendez JA, Soares NC, Mateos J, Gayoso C, Rumbo C, Aranda J, et al. Extracellular proteome of a highly invasive multidrug-resistant clinical strain of *Acinetobacter baumannii*. *J Proteome Res* 2012; 11:5678-94.

20. Loehfelm TW, Luke NR, Campagnari AA. Identification and characterization of an *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein. *J Bacteriol* 2008; 190:1036-44.

21. Choi AH, Slamti L, Avci FY, Pier GB, Maira-Litrán T. The pgaABCD locus of *Acinetobacter baumannii* encodes the production of poly-beta-1-6-N-acetylglucosamine, which is critical for biofilm formation. *J Bacteriol* 2009; 191:5953-63.

22. Tomaras AP, Flagler MJ, Dorsey CW, Gaddy JA, Actis LA. Characterization of a two-component regulatory system from *Acinetobacter baumannii* that controls biofilm formation and cellular morphology. *Microbiology* 2008; 154:3398-409.

23. Tomaras AP, Dorsey CW, Edelmann RE, Actis LA. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology* 2003; 149:3473-84.

24. de Breij A, Gaddy J, van der Meer J, Koning R, Koster A, van den Broek P, et al. CsuA/BABCDE-dependent pili are not involved in the adherence of *Acinetobacter baumannii* ATCC19606(T) to human airway epithelial cells and their inflammatory response. *Research in microbiology* 2009; 160:213-8.

25. Gaddy JA, Tomaras AP, Actis LA. The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells. *Infection and immunity* 2009; 77:3150-60.

26. Dashper SG, Butler CA, Lissel JP, Paolini RA, Hoffmann B, Veith PD, et al. A novel *Porphyromonas gingivalis* FeoB plays a role in manganese accumulation. *J Biol Chem* 2005; 280:28095-102.
27. Nairz M, Schroll A, Sonnweber T, Weiss G. The struggle for iron - a metal at the host-pathogen interface. *Cell Microbiol* 2010; 12:1691-702.
28. Chu BC, Garcia-Herrero A, Johanson TH, Krewulak KD, Lau CK, Peacock RS, et al. Siderophore uptake in bacteria and the battle for iron with the host; a bird's eye view. *Biometals* 2010; 23:601-11.
29. Proschak A, Lubuta P, Grun P, Lohr F, Wilharm G, De Berardinis V, et al. Structure and biosynthesis of fimsbactins A-F, siderophores from *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter baylyi*. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 2013; 14:633-8.
30. Penwell WF, DeGrace N, Tentarelli S, Gauthier L, Gilbert CM, Arivett BA, et al. Discovery and Characterization of New Hydroxamate Siderophores, Baumannoferrin A and B, produced by *Acinetobacter baumannii*. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 2015.
31. Shapiro JA, Wencewicz TA. Acinetobactin Isomerization Enables Adaptive Iron Acquisition in *Acinetobacter baumannii* through pH-Triggered Siderophore Swapping. *ACS infectious diseases* 2016; 2:157-68.
32. Weaver EA, Wyckoff EE, Mey AR, Morrison R, Payne SM. FeoA and FeoC are essential components of the *Vibrio cholerae* ferrous iron uptake system, and FeoC interacts with FeoB. *J Bacteriol* 2013; 195:4826-35.
33. Naikare H, Palyada K, Panciera R, Marlow D, Stintzi A. Major role for FeoB in *Campylobacter jejuni* ferrous iron acquisition, gut colonization, and intracellular survival. *Infect Immun* 2006; 74:5433-44.

# Capítulos

---

34. Mortensen BL, Skaar EP. The contribution of nutrient metal acquisition and metabolism to *Acinetobacter baumannii* survival within the host. *Front Cell Infect Microbiol* 2013; 3:95.
35. Runyen-Janecky LJ, Reeves SA, Gonzales EG, Payne SM. Contribution of the *Shigella flexneri* Sit, Iuc, and Feo iron acquisition systems to iron acquisition *in vitro* and in cultured cells. *Infect Immun* 2003; 71:1919-28.
36. Robey M, Cianciotto NP. *Legionella pneumophila* *feoAB* promotes ferrous iron uptake and intracellular infection. *Infect Immun* 2002; 70:5659-69.
37. Velayudhan J, Hughes NJ, McColm AA, Bagshaw J, Clayton CL, Andrews SC, et al. Iron acquisition and virulence in *Helicobacter pylori*: a major role for FeoB, a high-affinity ferrous iron transporter. *Molecular microbiology* 2000; 37:274-86.
38. Stojiljkovic I, Cobeljic M, Hantke K. *Escherichia coli* K-12 ferrous iron uptake mutants are impaired in their ability to colonize the mouse intestine. *FEMS Microbiol Lett* 1993; 108:111-5.
39. Boyer E, Bergevin I, Malo D, Gros P, Cellier MF. Acquisition of Mn(II) in addition to Fe(II) is required for full virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* 2002; 70:6032-42.
40. Kammler M, Schön C, Hantke K. Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1993; 175:6212-9.
41. Stevenson B, Wyckoff EE, Payne SM. *Vibrio cholerae* FeoA, FeoB, and FeoC Interact To Form a Complex. *J Bacteriol* 2016; 198:1160-70.
42. Hantke K. Regulation of ferric iron transport in *Escherichia coli* K12: isolation of a constitutive mutant. *Mol Gen Genet* 1981; 182:288-92.

43. K. Hantke. 2004. Ferrous Iron Transport, p 178-184. In Crosa J, Mey A, Payne S, Iron Transport in Bacteria. ASM Press, Washington, DC. doi: 10.1128/9781555816544.ch12.
44. Hantke K. Selection procedure for deregulated iron transport mutants (*fur*) in *Escherichia coli* K 12: *fur* not only affects iron metabolism. Mol Gen Genet 1987; 210:135-9.
45. Cartron ML, Maddocks S, Gillingham P, Craven CJ, Andrews SC. Feo-transport of ferrous iron into bacteria. Biometals 2006; 19:143-57.
46. Subashchandrabose S, Smith S, DeOrnellas V, Crepin S, Kole M, Zahdeh C, et al. *Acinetobacter baumannii* Genes Required for Bacterial Survival during Bloodstream Infection. mSphere 2016; 1.
47. Antunes LC, Imperi F, Towner KJ, Visca P. Genome-assisted identification of putative iron-utilization genes in *Acinetobacter baumannii* and their distribution among a genotypically diverse collection of clinical isolates. Research in microbiology 2011; 162:279-84.
48. Beceiro A, Tomas M, Bou G. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? Clinical microbiology reviews 2013; 26:185-230.
49. Dorsey CW, Beglin MS, Actis LA. Detection and analysis of iron uptake components expressed by *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. Journal of clinical microbiology 2003; 41:4188-93.
50. Catel-Ferreira M, Marti S, Guillon L, Jara L, Coadou G, Molle V, et al. The outer membrane porin OmpW of *Acinetobacter baumannii* is involved in iron uptake and colistin binding. FEBS letters 2016; 590:224-31.

# Capítulos

---

51. Catel-Ferreira M, Nehme R, Molle V, Aranda J, Bouffartigues E, Chevalier S, et al. Deciphering the function of the outer membrane protein OprD homologue of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2012; 56:3826-32.
52. Murray GL, Tsyganov K, Kostoulias XP, Bulach DM, Powell D, Creek DJ, et al. Global gene expression profile of *Acinetobacter baumannii* during bacteremia. *The Journal of infectious diseases* 2017; 215:S52-S7.
53. Miethke M, Marahiel MA. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 2007; 71:413-51.
54. Zimble DL, Penwell WF, Gaddy JA, Menke SM, Tomaras AP, Connerly PL, et al. Iron acquisition functions expressed by the human pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Biometals: an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 2009; 22:23-32.
55. Harding RA, Royt PW. Acquisition of iron from citrate by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of general microbiology* 1990; 136:1859-67.
56. Ratledge C, Dover LG. Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annual review of microbiology* 2000; 54:881-941.
57. Marshall B, Stintzi A, Gilmour C, Meyer JM, Poole K. Citrate-mediated iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of the citrate-inducible FecA receptor and the FeoB ferrous iron transporter. *Microbiology* 2009; 155:305-15.
58. Ganne G, Brillet K, Basta B, Roche B, Hoegy F, Gasser V, et al. Iron Release from the Siderophore Pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa* Involves Three New Actors: FpvC, FpvG, and FpvH. *ACS chemical biology* 2017; 12:1056-65.
59. Louvel H, Saint Girons I, Picardeau M. Isolation and characterization of FecA- and FeoB-mediated iron acquisition systems of the spirochete *Leptospira biflexa* by random insertional mutagenesis. *Journal of bacteriology* 2005; 187:3249-54.



60. Sahl JW, Gillece JD, Schupp JM, Waddell VG, Driebe EM, Engelthaler DM, et al. Evolution of a pathogen: a comparative genomics analysis identifies a genetic pathway to pathogenesis in *Acinetobacter*. PLoS one 2013; 8:e54287.
61. Rumbo-Feal S, Gomez MJ, Gayoso C, Alvarez-Fraga L, Cabral MP, Aransay AM, et al. Whole transcriptome analysis of *Acinetobacter baumannii* assessed by RNA-sequencing reveals different mRNA expression profiles in biofilm compared to planktonic cells. PLoS One 2013; 8:e72968.
62. Eijkelkamp BA, Hassan KA, Paulsen IT, Brown MH. Investigation of the human pathogen *Acinetobacter baumannii* under iron limiting conditions. BMC genomics 2011; 12:126.
63. Miller AF. Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights. FEBS Lett 2012; 586:585-95.
64. Lenski RE. Quantifying fitness and gene stability in microorganisms. Biotechnology 1991; 15:173-92.
65. Madigan MT MJ, Dunlap PV, Clark DP. Brock biology of microorganisms. 12th ed. Pearson Education Inc, 2009.
66. Hassett DJ, Cohen MS. Bacterial adaptation to oxidative stress: implications for pathogenesis and interaction with phagocytic cells. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 1989; 3:2574-82.
67. Rumbo-Feal S, Perez A, Ramelot TA, Alvarez-Fraga L, Vallejo JA, Beceiro A, et al. Contribution of the *A. baumannii* A1S\_0114 Gene to the Interaction with Eukaryotic Cells and Virulence. Frontiers in cellular and infection microbiology 2017; 7:108.
68. Álvarez-Fraga L, Pérez A, Rumbo-Feal S, Merino M, Vallejo JA, Ohneck EJ, et al. Analysis of the role of the LH92\_11085 gene of a biofilm hyper-producing

# Capítulos

---

*Acinetobacter baumannii* strain on biofilm formation and attachment to eukaryotic cells. *Virulence* 2016; 7:443-55.

69. Hamad MA, Zajdowicz SL, Holmes RK, Voskuil MI. An allelic exchange system for compliant genetic manipulation of the select agents *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. *Gene* 2009; 430:123-31.

70. CLSI W, PA, USA. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically—Tenth Edition: Approved Standard M07-A10. . 2015.

71. Hornsey M, Longshaw C, Phee L, Wareham DW. *In vitro* activity of telavancin in combination with colistin versus Gram-negative bacterial pathogens. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56:3080-5.

72. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *Journal of the American Statistical Association* 1958; 53:457-81.

73. Lopez-Rojas R, Dominguez-Herrera J, McConnell MJ, Docobo-Perez F, Smani Y, Fernandez-Reyes M, et al. Impaired virulence and *in vivo* fitness of colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*. *The Journal of infectious diseases* 2011; 203:545-8.

74. Rodriguez-Hernandez MJ, Pachon J, Pichardo C, Cuberos L, Ibanez-Martinez J, Garcia-Curiel A, et al. Imipenem, doxycycline and amikacin in monotherapy and in combination in *Acinetobacter baumannii* experimental pneumonia. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2000; 45:493-501.

**Table 1.** Interaction of genes A1S\_0242, A1S\_3850 and A1S\_0652 measured by qRT-PCR.

	ATCC 17978	$\Delta$ 0242*	$\Delta$ 3850*	$\Delta$ 0242/ $\Delta$ 3850*
A1S_0242	1	0	1.02 +/- 0.32	0
A1S_0652	1	0.97 +/- 0.21	2.73 +/- 1.09	1.11 +/- 0.48
A1S_3850	1	0.97 +/- 0.04	0	0

\*Data were obtained as a fold-change relative to the ATCC 17978 sample (value 1), using the *rpoB* gene as housekeeping for normalization.

**Table 2.** Bacterial strains and plasmids used in this work.

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Sources or references
<b>STRAINS</b>		
<b><i>A. baumannii</i></b>		
ATCC 17978	Clinical isolate	ATCC
$\Delta$ 0242	A1S_0242 gene deletion mutant obtained from the ATCC 17978 strain	This study
ATCC 17978 + pWH1266-Km	ATCC 17978 harboring the empty pWH1266-Km plasmid; Km <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup>	This study
$\Delta$ 0242 + pWH1266-Km	$\Delta$ 0242 harboring the empty pWH1266-Km plasmid; Km <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup>	This study
$\Delta$ 0242 complemented	$\Delta$ 0242 harboring the pWH1266-Km-0242 plasmid; Km <sup>R</sup>	This study
$\Delta$ 3850	A1S_3850 gene deletion mutant obtained from the ATCC 17978 strain	This study
$\Delta$ 3850 + pWH1266-Km	$\Delta$ 3850 harboring the empty pWH1266-Km plasmid; Km <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup>	This study
$\Delta$ 3850 complemented	$\Delta$ 3850 harboring the pWH1266-Km-3850 plasmid; Km <sup>R</sup>	This study

# Capítulos

---

$\Delta$ 0242/ $\Delta$ 3850 A1S\_0242 and A1S\_3850 genes deletion double mutant This study obtained from the ATCC 17978 strain

## *E. coli*

TG1 Used for DNA recombinant methods Lucigen

---

## PLASMIDS

---

pWH1266-Km	<i>A. baumannii</i> shuttle vector; Km <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup>	Álvarez-Fraga <i>et al.</i> 2016 <sup>68</sup>
pWH1266-Km-0242	pWH1266-Km harboring the A1S_0242 gene; Km <sup>R</sup>	This study
pWH1266-Km-3850	pWH1266-Km harboring the A1S_3850 gene; Km <sup>R</sup>	This study
pMo130	Suicide vector for the construction of <i>A. baumannii</i> isogenic derivative; Km <sup>R</sup> , SacB, XylE	Hamad <i>et al.</i> 2009 <sup>69</sup>

---

Km<sup>R</sup>: kanamycin resistance. Tet<sup>R</sup>: tetracycline resistance.

**Table 3.** Susceptibility to oxidative stress generated by paraquat.

	MICs to paraquat (mg/L)	
	MH broth	MH broth + 100 μM BIP
ATCC 17978	64	32
Δ0242	32	8
Δ3850	64	32
Δ0242/Δ3850	32	8
MICs to paraquat (mg/L) with strains carrying the pWH1266-Km vector		
ATCC 17978 + pWH1266-Km	8	4
Δ0242 + pWH1266-Km	4	1
Δ0242 complemented	4	4

**Table 4.** Mortality of *G. mellonella* infected with the *A. baumannii* ATCC 17978 and its derivative strains using lethal dose 50 (LD<sub>50</sub>) and lethal dose 100 (LD<sub>100</sub>).

Strains	Bacterial inoculum (CFUs/larva)						LD <sub>50</sub> 24 h	LD <sub>100</sub> 24 h
	8*10 <sup>5</sup>	2*10 <sup>5</sup>	8*10 <sup>4</sup>	2.6*10 <sup>4</sup>	8*10 <sup>3</sup>	2.6*10 <sup>3</sup>		
ATCC 17978	100	100	85.7	57.1	42.8	0	1.9*10 <sup>4</sup>	17*10 <sup>4</sup>
Δ0242	100	71.4	57.1	0	0	0	10.5*10 <sup>4</sup>	63*10 <sup>4</sup>
Δ3850	100	100	100	42.8	28.5	0	1.95*10 <sup>4</sup>	11.7*10 <sup>4</sup>
Δ0242/Δ3850	100	85.7	57.1	0	0	0	9.3*10 <sup>4</sup>	53.2*10 <sup>4</sup>
Strains	Mortality of larvae (%) at 144 h						LD <sub>50</sub> 144 h	LD <sub>100</sub> 144 h
ATCC 17978	100	100	100	85.7	42.8	0	1*10 <sup>4</sup>	6*10 <sup>4</sup>
Δ0242	100	100	85.7	14.2	0	0	4.35*10 <sup>4</sup>	18.1*10 <sup>4</sup>
Δ3850	100	100	100	100	28.5	0	1.15*10 <sup>4</sup>	3.05*10 <sup>4</sup>
Δ0242/Δ3850	100	100	85.7	42.8	0	0	3.4*10 <sup>4</sup>	16.4*10 <sup>4</sup>

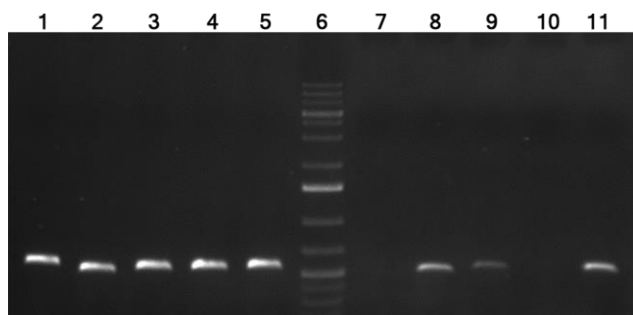
# Capítulos

---

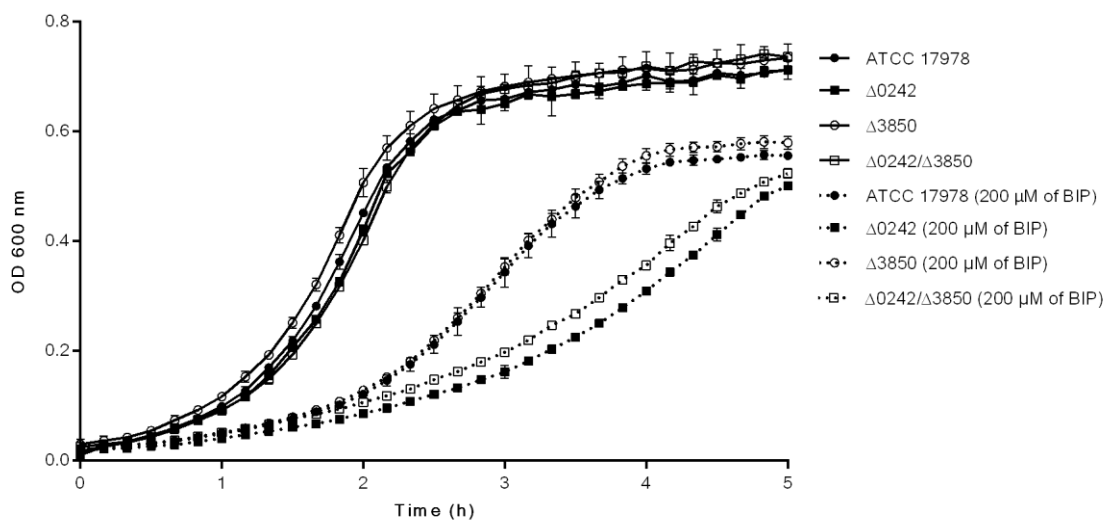
**Table 5.** Effect of *feoA* gene (A1S\_0242) inactivation over bacterial load in lungs, blood and mice survival.

Treatment group ( <i>n</i> )	Bacterial load in lung (mean log <sub>10</sub> CFU/g of lung +/- SD)	% Sterile blood cultures	Mean of survival time (h) of mice
ATCC 17978 (12)	11.04 (+/- 0.35)	8.4%	43.4
Δ0242 (12)	10.04 (+/- 0.29)	75%	64.1 <sup>a</sup>

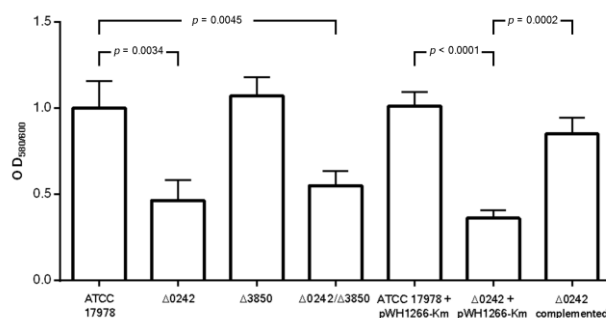
<sup>a</sup>: Two mice survived at 72 h.



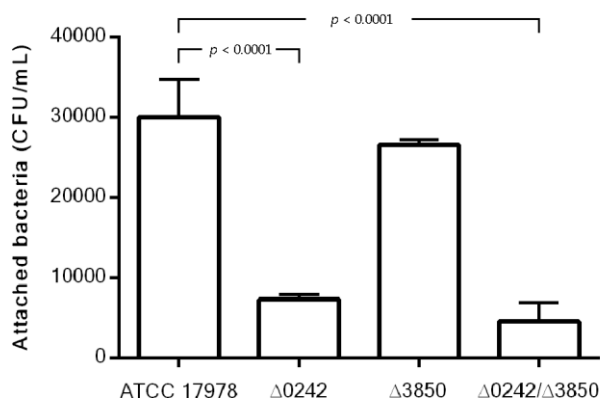
**Figure 1.** cDNA amplification of genes from the A1S\_0242-0244 operon of *A. baumannii* ATCC 17978 strain. The intergenic regions from genes A1S\_0242-0243 and A1S\_0243-0244 are shown in lanes 8 and 9, respectively. The intergenic regions from genes A1S\_0241-0242 and A1S\_0244-0245 are shown in lanes 7 and 10, respectively (negative controls). Genomic DNA was used as template for positive control (lanes 1 to 5, respectively). Lanes 5 and 11 show the *gyrB* amplification from DNA and cDNA, respectively (positive controls). Lane 6 shows GeneRuler 1 Kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).



**Figure 2.** Growth curves of the ATCC 17978 strain and the isogenic mutant derivative strains  $\Delta 0242$ ,  $\Delta 3850$  and  $\Delta 0242/\Delta 3850$  in presence and absence of the iron chelator 2,2'-bipyridyl (BIP). Data correspond to the mean of three replicates and bars represent the standard deviations.

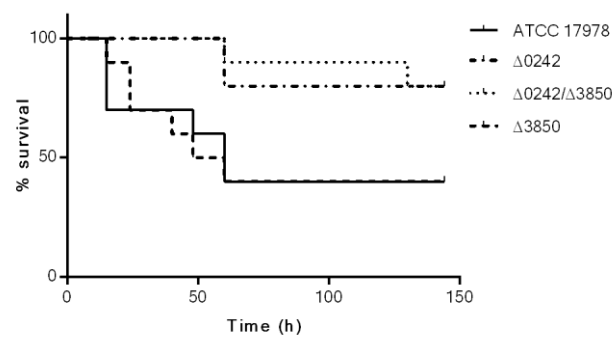


**Figure 3.** Quantification of biofilm formation by the *A. baumannii* ATCC 17978 strain, the mutant derivative strain  $\Delta 0242$ , the mutant derivative strain  $\Delta 3850$ , the double mutant derivative strain  $\Delta 0242/\Delta 3850$ , the ATCC 17978 harboring the empty vector pWH1266-Km (ATCC 17978 + pWH1266-Km), the mutant derivative strain harboring the empty vector pWH1266-Km ( $\Delta 0242$  + pWH1266-Km) and the mutant derivative  $\Delta 0242$  over-expressing the A1S\_0242 gene from the pWH1266-Km plasmid ( $\Delta 0242$  complemented).

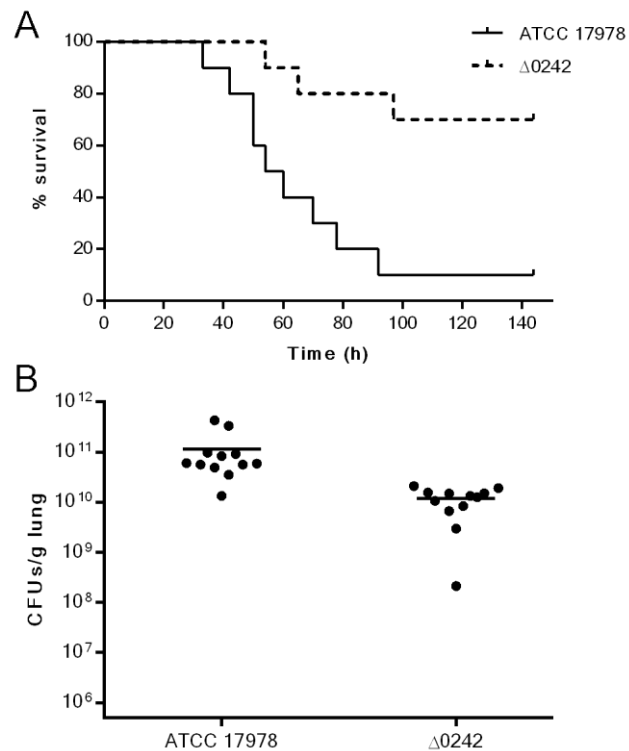


**Figure 4.** Quantification of bacterial adhesion to A549 cells by the *A. baumannii* ATCC 17978 strain, the mutant derivative strain  $\Delta 0242$ , the mutant derivative strain  $\Delta 3850$  and the double mutant strain  $\Delta 0242/\Delta 3850$ .





**Figure 5.** Survival of *Galleria mellonella* larvae (n= 10 per group) after infection with *A. baumannii* ATCC 17978,  $\Delta 0242$ ,  $\Delta 3850$  and  $\Delta 0242/\Delta 3850$  strains. Survival was significantly higher in caterpillars infected with the  $\Delta 0242$  mutant than those infected with the wild type strain ( $p < 0.05$ ). No deaths were observed in any of the two control groups (not injected and injected with sterile PBS).



**Figure 6.** Pneumonia infection in mice. A) Survival of BALB/c ( $n = 10$  per group) mice after pneumonia infection with *A. baumannii* ATCC 17978 and  $\Delta 0242$  strains. Survival was significantly higher in mice infected with the  $\Delta 0242$  mutant ( $p < 0.01$ ). B) Bacterial load determination in lungs in mice infected with the ATCC 17978 strain and the  $\Delta 0242$  mutant. Bacterial load ( $p < 0.01$ ) was significantly lower in mice infected with the  $\Delta 0242$  mutant.

**Material suplementario**

**Table S1.** Gene expression of the A1S\_0242 and the A1S\_3850 genes of *A. baumannii* ATCC 17978 and its derivative strains measured by qRT-PCR.

Strain	Expresión level of the A1S_0242 gene
ATCC 17978	1
Δ0242	0*
Δ0242 + pWH1266-Km	0*
Δ0242 complemented	100 +/- 38.2*
Strain	Expression level of the A1S_3850 gene
ATCC 17978	1
Δ3850	0*
Δ3850 + pWH1266-Km	0*
Δ3850 complemented	724 +/- 217

\*Data were obtained as a fold-change relative to the ATCC 17978 sample (value 1), using the *rpoB* gene as housekeeping for normalization.

**Table S2.** Oligonucleotides and probes used in the present work.

Primer/Probe name	Sequence	Use in the present study
A1S_0242UPFw	gggggatccccactatgaccagtaacatt	Construction of the Δ0242 strain
A1S_0242UPRv	ggggatatccccatccgatcctaaacctttt	Construction of the Δ0242 strain
A1S_0242DOWNFw	ggggatatccccaaattcaagtagaagaagga	Construction of the Δ0242 strain
A1S_0242DOWNRv	ggggcatgccccgaatgaaagcagctccactt	Construction of the Δ0242 strain
A1S_0242intUPFw	ttcactacattggatcaggt	Confirmation the deletion of the A1S_0242 gene
A1S_0242intDOWNRv	atcgagcactcgaaccgaa	Confirmation the deletion of the A1S_0242 gene

# Capítulos

---

A1S_3850UPFw	ggggcggccgccgactttcatcagtgactat	Construction of the $\Delta$ 3850 strain
A1S_3850UPRv	cccgagctcaacaattttgacaaagtcgttt	Construction of the $\Delta$ 3850 strain
A1S_3850DOWNFw	ggggagctctcaaatgaacagtaaaaatatt	Construction of the $\Delta$ 3850 strain
A1S_3850DOWNRv	cccggatccaattgcacaggcaaaaactag	Construction of the $\Delta$ 3850 strain
A1S_3850intUPFw	gtggagcacatatgaaagc	Confirmation the deletion of the A1S_3850 gene
A1S_3850intDOWNRv	tccagctcacctaagcata	Confirmation the deletion of the A1S_0242 gene
pMo130 site2 Fw	attcatgaccgtgctgac	Confirmation the plasmid construction
pMo130 site2 Rv	cttgctgtaagcggatg	Confirmation the plasmid construction
A1S_0242EcoRVFw	cccgatatcatgtatactagtaaaaaagg	Cloning the A1S_0242 gene into the pWH1266-Km plasmid to complement the $\Delta$ 0242 strain
A1S_0242BamHIRv	cccggatcctcatgcccgtactccttctt	Cloning the A1S_0242 gene into the pWH1266-Km plasmid to complement the $\Delta$ 0242 strain
A1S_3850EcoRVFw	cccgatatcatgaatttattccaagttaa	Cloning the A1S_3850 gene into the pWH1266-Km plasmid to complement the $\Delta$ 3850 strain
A1S_3850BamHIRv	cccggatccttactgttcatttgaaacaa	Cloning the A1S_3850 gene into the pWH1266-Km plasmid to complement the $\Delta$ 3850 strain
pWH1266Fw	taggcttggttatgccgta	Confirmation the complementation of the $\Delta$ 0242 and the $\Delta$ 03850 strains
pWH1266Rv	aaggagctgactgggttgaa	Confirmation the complementation of the $\Delta$ 0242

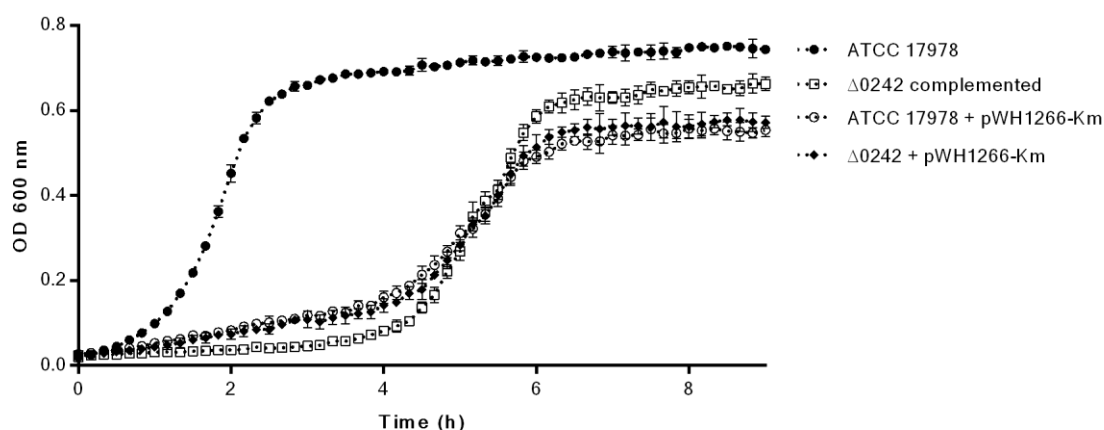
---

---

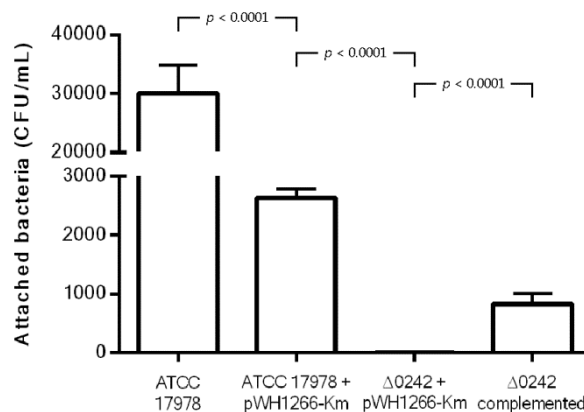
		and the $\Delta$ 03850 strains
A1S_0242RTFw	tcagcgttgaaagtgaagca	qRT-PCR
A1S_0242RTRv	gaattgcgaccaaactcttgc	qRT-PCR
A1S_0242Probe	catcacca	qRT-PCR
A1S_0243RTFw	gctctggttcttgtgtactttcc	qRT-PCR
A1S_0243RTRv	tgtaatctatagcaggcaatgtcg	qRT-PCR
A1S_0243 Probe	accaccag	qRT-PCR
A1S_0244RTFw	tgacttttggttgcaggt	qRT-PCR
A1S_0244RTRv	tgccatttaactggtttaatttctt	qRT-PCR
A1S_0244 Probe	tgtggctg	qRT-PCR
A1S_0652RTFw	cacaagcagaagttcgtgtca	qRT-PCR
A1S_0652RTRv	tccaatttgaacgagaataggg	qRT-PCR
A1S_0652 Probe	ttggtggt	qRT-PCR
rpoBRTFw	tcgtgtatctgcgcttgg	qRT-PCR
rpoBRTRv	cgtacttcgaagcctgcac	qRT-PCR
rpoB Probe	Accaccag	qRT-PCR
A1S_0241-0242Fw	cttcgtaatttctgttcacg	Operon characterization
A1S_0241-0242Rv	aattgcgaccaaactcttgc	Operon characterization
A1S_0242-0243Fw	tggaaagtctgggttttgta	Operon characterization
A1S_0242-0243Rv	gaccaactcgatcatttc	Operon characterization
A1S_0243-0244Fw	cgctccagttggttttaac	Operon characterization
A1S_0243-0244Rv	tggtttcagccattttgcta	Operon characterization
A1S_0244-0245Fw	aatgacttttggttgcag	Operon characterization
A1S_0244-0245Rv	gcaataactggatatcgcc	Operon characterization
gyrBFw	ggcttaaaccagtatcttga	Operon characterization
gyrBRv	cagccaagtgcgtgaattaa	Operon characterization

---





**Figure S1.** Growth curves of the ATCC 17978 strain and its derivative strains carrying the pWH1266-Km vector. Data correspond to the mean of three replicates and bars represent the standard deviations.



**Figure S2.** Quantification of bacterial adhesion to A549 cells by the *A. baumannii* ATCC 17978 strain (ATCC 17978), the ATCC 17978 strain harboring the empty pWH1266-Km vector (ATCC+pWH1266-Km), the mutant derivative strain  $\Delta 0242$  harboring the empty pWH1266-Km vector ( $\Delta 0242$ +pWH1266-Km) and the mutant derivative strain  $\Delta 0242$  harboring the pWH1266-Km vector containing the A1S\_0242 gene ( $\Delta 0242$  complemented).





# DISCUSIÓN



## IV. DISCUSIÓN

*Acinetobacter baumannii* ha emergido en los últimos años como un importante patógeno siendo cada vez más frecuentes las infecciones y brotes hospitalarios causados por este microorganismo a lo largo de todo el mundo (3, 17, 186). En febrero del 2017, la Organización Mundial de la Salud incluyó a *A. baumannii* dentro de la lista de microorganismos patógenos que requieren investigación y desarrollo de nuevos antibióticos con prioridad crítica (52). Son muchos los factores que contribuyen a la patogenicidad de *A. baumannii* y a su éxito como agente infeccioso. La presente tesis doctoral tiene como finalidad el estudio de dos factores de virulencia que podrían explicar parcialmente la habilidad que tiene *A. baumannii* para sobrevivir, adaptarse, propagarse o causar una infección bajo condiciones desfavorables.

La capacidad que tiene esta especie para persistir en ambientes hospitalarios podría ser atribuida, en parte, a su habilidad para adherirse a células humanas y de formar *biofilm*, tanto sobre superficies bióticas como abióticas, ya que estas bacterias asociadas al *biofilm* son más resistentes al estrés (47).

La cepa de *A. baumannii* MAR002 fue seleccionada por su extraordinaria capacidad de formar *biofilm*. Dicha cepa fue aislada a partir de una herida de un paciente en el Hospital del Mar de Barcelona en el año 2010 durante el II Estudio Español de Colonizaciones/Infecciones por *Acinetobacter baumannii* (GEIH/REIPI-Ab2010) (187). La cepa MAR002, a pesar de pertenecer a una colección de cepas clínicas, resultó ser sensible a la mayoría de los antibióticos. Se realizó la secuenciación y posterior análisis de su genoma en busca de genes que pudieran estar implicados en la capacidad de la cepa MAR002 para formar *biofilm*.

La secuenciación de genomas completos nos permite la identificación del catálogo completo de genes que un organismo puede expresar en cualquier momento de su ciclo vital. Esto abre una nueva vía para el estudio de la biología bacteriana, ayudando a una mejor comprensión de la plasticidad genómica, epidemiología o adquisición/pérdida

## Discusión

---

de genes relacionados con resistencia y patogenicidad. Además, la secuenciación de genomas de distintas cepas permite la realización de estudios evolutivos y filogenéticos.

El método de secuenciación automática de Sanger dominó la industria de secuenciación de ADN durante casi 20 años. A pesar de ser la tecnología con la que se secuenció el primer genoma bacteriano y la primera secuencia completa del genoma humano, este método presenta muchas limitaciones. Las tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS) surgen de esa necesidad de desarrollar nuevas y mejores alternativas a la tecnología Sanger para la secuenciación de gran número de genomas en menos tiempo (188).

La aparición de estas tecnologías de secuenciación de nueva generación en el año 2005 impulsó un gran avance en el campo de la secuenciación de genomas y de la biología en general. La ventaja de estas tecnologías es que permiten el procesamiento masivo y en paralelo de las muestras, reduciendo los costes y el tiempo de obtención de la secuencia genómica (188). Paralelamente a la aparición de estas tecnologías de secuenciación, ha sido imprescindible el desarrollo de nuevas y más potentes herramientas bioinformáticas que permiten analizar y procesar la enorme cantidad de datos que se generan.

Dentro de las plataformas de secuenciación de nueva generación que se encuentran actualmente en mercado encontramos 454 (Roche), Solexa (Illumina), Ion Torrent (Life Technologies), Helicos y Pacific Biosciences (PacBio).

La tecnología 454, comercializada por Roche, se fundamenta en la pirosecuenciación, una metodología que se basa en la detección quimioluminiscente del pirofosfato liberado durante la elongación de la cadena de ADN. En la actualidad, esta plataforma está prácticamente en desuso, ya que el resto de las tecnologías existentes ofrecen mejores resultados (189). La plataforma Solexa (Illumina) es la más utilizada en la actualidad, y consiste en una técnica de terminación reversible cíclica y se caracteriza por el uso de nucleótidos marcados con fluoróforos que bloquean de forma reversible la elongación de la cadena (190). La plataforma Ion Torrent tiene un funcionamiento

semejante a la pirosecuenciación pero, en lugar de transformar en luz el pirofosfato liberado, se mide el cambio de pH (191). Además, se han desarrollado tecnologías que no utilizan el paso inicial de amplificación, sino que secuencian directamente una sola molécula de ADN, entre las que se encuentran Helicos y Pacific Biosciences (PacBio) (192). Entre todas las tecnologías disponibles en el mercado se utilizó la tecnología basada en la pirosecuenciación para secuenciar el genoma de la cepa *A. baumannii* MAR002.

En un estudio comparativo de tres instrumentos de secuenciación, 454 GS Junior (Roche), MiSeq (Illumina) y Ion Torrent PGM (Life Technologies), se concluyó que cada uno de ellos tenía sus ventajas y sus inconvenientes. El mayor rendimiento por carrera y la mayor cobertura se obtuvo con la tecnología MiSeq mientras que las lecturas más largas se obtuvieron con el 454 GS Junior. Tanto Ion Torrent PGM como 454 tuvieron una tasa de error más elevada que MiSeq ya que se vio que tenían muchos problemas para medir los homopolímeros (bases iguales repetidas) (193). Los resultados de la secuenciación de la cepa de *E. coli* O104:H4 mostraron unos resultados similares a los de nuestro trabajo de secuenciación del genoma de la cepa de *A. baumannii* MAR002. En una única carrera del 454 GS Junior de la librería de *A. baumannii* MAR002 se obtuvieron un total de 163,265 lecturas con un tamaño medio de 541.12 pb las cuales se ensamblaron en 119 *contigs*, 111 de ellos resultaron ser de más de 500 pb. Una ventaja de esta tecnología es que, al generar lecturas más largas, estas se pueden ensamblar más fácilmente en *contigs*. El protocolo que se realizó para secuenciar el genoma de la cepa *A. baumannii* MAR002 fue de tipo *single-end*. En esta metodología los fragmentos de ADN se secuencian únicamente desde un extremo y su tamaño no se conoce. El resultado del ensamblaje consistió en un conjunto de *contigs* desordenados, pero no se obtuvo ninguna información sobre su orden en el genoma ni sobre el tamaño de los huecos que habría entre ellos. Este problema se podría solucionar utilizando la técnica de extremos pareados (*paired-end*). Mientras que en la estrategia original de secuenciación se obtiene la lectura de un único extremo de cada fragmento (*single-end*), la secuenciación de extremos pareados proporciona la secuencia de ambos extremos de cada fragmento, siempre separados por una distancia conocida. Esta técnica permite

## Discusión

---

conocer la distancia entre los *contigs* y su organización para obtener fragmentos de mayor tamaño (194).

Los 119 *contigs* se ensamblaron finalmente en dos *scaffolds*: el *scaffold* 01 (código GenBank JRH01000001), con una longitud de 2,960,191 pb y el *scaffold* 02 (código GenBank JRH01000002), con una longitud de 757,739 pb. Cuando se realizó un alineamiento de los dos *scaffolds* de MAR002 con el genoma completo de la cepa tipo ATCC 17978 se observó que el hueco entre ambos *scaffolds* se correspondía con un gen de gran tamaño que codifica una proteína de secreción tipo I. Este tipo de genes se caracterizan por tener regiones largas repetidas en tándem lo cual constituye un problema a la hora de realizar el ensamblaje. Cuando una lectura proviene de una zona repetida, y es más pequeña que esta, no se puede saber con certeza de cuál de las regiones repetidas se obtuvo y, por lo tanto, se pueden crear falsas uniones en el genoma. En nuestro caso en particular resultó imposible la unión de estos dos *scaffolds* siendo esta la causa más probable (195). Al igual que en el caso de la ordenación de los *contigs*, este problema también se podría haber solucionado realizando la técnica de extremos pareados ya que se podría conocer la distancia entre los *contigs* y, por lo tanto, poder unir estos dos *scaffolds* para obtener una secuencia única del genoma de MAR002.

Tras la secuenciación, el ensamblaje y la anotación automática de los dos *scaffolds* de MAR002 mediante herramientas bioinformáticas, se predijeron 3,300 secuencias codificantes, 75 pseudogenes, 69 ARNt y 6 *clusters* de ARNr. En marzo del pasado año la anotación del genoma de MAR002 se actualizó modificándose los datos originales de tal forma que el genoma de MAR002 actual está formado por 3298 secuencias codificantes, 120 pseudogenes, 69 ARNt y 6 *clusters* de ARNr. Estos cambios en la anotación podrían ser debidos a una actualización y mejora del programa bioinformático del NCBI utilizado para realizar la anotación.

Un análisis con el programa bioinformático PHAST mostró la presencia de un bacteriófago intacto integrado dentro del genoma de MAR002. Se considera que ese fago está intacto ya que contiene todos los genes necesarios, genes que codifican proteínas de la cabeza, genes que codifican la cola y genes que codifican integrasas, entre otros. Se

podría pensar que bajo ciertas condiciones este fago podría entrar en fase lítica y provocar la lisis de la bacteria, evento que ya se ha descrito en otras cepas de *A. baumannii* (196). La presencia de bacteriófagos integrados en el genoma bacteriano es bastante común por lo que no es raro que MAR002 contenga uno (197, 198). Debido a su capacidad lítica, estos bacteriófagos cada vez han captado más la atención como agentes antibacterianos ya que actuarían reduciendo la población bacteriana específica (199). Las terapias con fagos son de gran interés para erradicar infecciones causadas por microorganismos multirresistentes.

El análisis del genoma descrito en el capítulo I llevó a la asignación de la cepa MAR002 dentro del grupo ST71. La gran mayoría de los brotes de *A. baumannii* son causados por un número limitado de cepas en todo el mundo que pertenecen a los clones que inicialmente se denominaron clones europeos y que, en la actualidad, se conocen como linajes clonales internacionales (IC) I, II y III (200, 201). Además de estos linajes clonales, recientemente, han aparecido otra serie de brotes causados por otros genotipos de *A. baumannii* (201). El ST71 no se pudo clasificar dentro de ningún linaje clonal, ni existen casos de brotes causados por cepas pertenecientes a este ST. Giannouli y colaboradores (202) realizaron un estudio en el que concluyen que la resistencia a la desecación, la capacidad de formar *biofilm* en superficies abióticas o la capacidad de adherencia a células humanas A549 podrían favorecer la propagación y persistencia en el ambiente hospitalario de cepas de *A. baumannii* pertenecientes a los clones I y II y a genotipos emergentes como ST25 o ST78. El ST71 tampoco se pudo clasificar dentro de ningún grupo emergente previamente clasificado como formador de *biofilm*.

A pesar de no pertenecer a ningún grupo conocido de productores de *biofilm*, MAR002 resultó tener una capacidad extraordinaria de formar *biofilm* y de adherirse a células eucariotas humanas (A549). La relación entre ambos procesos no está muy clara. Lee y colaboradores (203) estudiaron la capacidad de *A. baumannii* de formar *biofilm* y de adherirse a células epiteliales humanas y concluyeron que hay una correlación positiva entre ambas. Sin embargo, hay otros estudios que demuestran que esta correlación no existe y por lo tanto serían dependientes de mecanismos diferentes (102, 204).

## Discusión

---

Se han publicado una serie de trabajos con cepas de *A. baumannii* con capacidad para adherirse y formar *biofilm*, donde se demuestra la implicación de estos dos procesos en la virulencia de la bacteria (102, 110). Ambas habilidades le dan una ventaja adaptativa a la bacteria ya que contribuyen a la colonización, persistencia e infección (205). Teniendo en cuenta la extraordinaria capacidad que tiene *A. baumannii* MAR002 de formar *biofilm*, se podría considerar esta cepa un modelo apropiado para el estudio de nuevos factores involucrados en la formación de *biofilm* y en la patogénesis de *A. baumannii*.

El análisis de la superficie de la cepa *A. baumannii* MAR002 mediante microscopía electrónica de transmisión mostró la existencia de dos tipos de pili de longitudes diferentes. Estos pili son apéndices localizados en la superficie bacteriana que podrían estar implicados en adherencia y formación de *biofilm* sobre superficies bióticas o abióticas. Tomaras y colaboradores (126) descubrieron que la cepa tipo ATCC 19606 formaba un pilus de tipo chaperona-usher esencial para la adherencia de la bacteria a superficies abióticas. Además, De Breij y colaboradores (128) identificaron otro pilus independiente del sistema Csu involucrado en la adherencia de *A. baumannii* a superficies bióticas. De esta forma, se puede pensar que la presencia de estos pili en la superficie de MAR002 podría ser, al menos en parte, la causa de su fenotipo hiperproductor de *biofilm* y de su capacidad de adherirse a células epiteliales humanas.

Basándonos en estas evidencias y, teniendo disponible la secuencia del genoma de la cepa de *A. baumannii* MAR002, se buscaron genes que pudieran estar relacionados con la formación de estos pili. En particular, se analizaron los niveles de expresión de los genes que codificaban las subunidades que formaban los pili. La mayoría de estos genes estaban sobreexpresados en células sésiles del *biofilm* en comparación con células planctónicas libres. Apoyándonos en estos datos de expresión y en datos bibliográficos se identificaron tres posibles candidatos por su potencial papel en la formación de *biofilm*. El gen LH92\_11085 (A1S\_2091 en *A. baumannii* ATCC 17978), el gen LH92\_07670 (A1S\_1510 en *A. baumannii* ATCC 17978) y el gen LH92\_08970 (no presente en *A. baumannii* ATCC 17978), los cuales estaban expresados 25, 4.4 y 1.9 veces más, respectivamente, en células libres comparadas con células del *biofilm*. Chabane y



colaboradores (129) realizaron un análisis de la matriz de los pellicles formados por diferentes cepas de *A. baumannii* e identificaron tres subunidades de pili de tipo chaperona-usher, la subunidad CsuA/B y las proteínas codificadas por los genes A1S\_1510 y A1S\_2091. Estos resultados concuerdan con los obtenidos durante este trabajo ya que, tanto el gen el LH92\_11085 (A1S\_2091) como el gen LH92\_07670 (A1S\_1510), se encontraron sobreexpresados en la etapa de *biofilm*. El gen que codifica la proteína CsuA/B no se encontró sobreexpresado en las células del *biofilm* de *A. baumannii* MAR002. Esto podría deberse a que el *biofilm* formado por la cepa MAR002 es independiente del sistema Csu.

Los sistemas de pili a los que pertenecen los genes A1S\_1510 y CsuA/B ya fueron estudiados y se demostró su implicación en la formación de *biofilm* (121, 126). A pesar de que el sistema A1S\_2088-2091 (homólogo del LH92\_11070-11085) no ha sido caracterizado funcionalmente, Giles y colaboradores (145) han sugerido que, de alguna manera, este sistema podría estar implicado en la formación del *biofilm*. El gen LH92\_11085 fue seleccionado como gen de estudio debido a sus datos de expresión, 25 veces más expresado en células sésiles que forman del *biofilm* que en células planctónicas.

Un análisis en profundidad del gen LH92\_11085 y de su entorno mostró que este gen forma parte de un operón que podría codificar un sistema de formación de pili. Este operón tiene las características típicas de los operones que codifican los sistemas de formación de pili tipo chaperona-usher. Es decir, estar formados por, como mínimo, un gen que codifica un usher, un gen que codifica una chaperona y un gen que codifica una subunidad del pilus o fimbria (124). El operón LH92\_11070-11085 está formado por un gen que codifica un usher (LH92\_11075), un gen que codifica una chaperona (LH92\_11080) y dos genes que codifican dos subunidades del pilus (LH92\_11070 y LH92\_11085). Los sistemas de pili de tipo chaperona-usher más estudiados son los sistemas Fim (pilus tipo I) y Pap (P pilus) descritos en *E. coli* (124). Se ha demostrado que estos sistemas intervienen en la adherencia de la bacteria *E. coli* a las células eucariotas (206). En *A. baumannii* ATCC 19606 también se describió un pili de este tipo denominado CsuA/BABCDE implicado en la adherencia a superficies abióticas y en la formación de

## Discusión

---

*biofilm* (126). Si comparamos todos estos sistemas se puede observar que estructuralmente son muy similares y todos están formados por una subunidad mayor que forma el cuerpo del pilus (FimA, PapA, CsuA/B y LH92\_11085), una chaperona (FimC, PapD, CsuC y LH92\_11080) y un usher (FimD, PapC, CsuD y LH92\_11075). La principal diferencia entre ellos radica en el número de subunidades diferentes que forman la punta del pilus. La punta del pili tipo I (sistema Fim) está formada por 3 subunidades (FimH, FimG y FimF), la punta del P pilus (sistema Pap) está formada por cuatro subunidades (PapG, PapF, PapE y PapK), la punta del pilus CsuA/BABCDE (sistema Csu) está formada por tres subunidades (CsuA, CsuB y CsuE) mientras que la punta del sistema LH92\_11085-11070 está formada sólo por una subunidad (LH92\_11070) (124, 126).

Utilizando programas bioinformáticos se observó que la proteína codificada por el gen LH92\_11085 tenía un porcentaje de identidad del 33% con respecto a la proteína CsuA/B seguido de un porcentaje de identidad del 16% con respecto a la proteína FimA de *E. coli* (207).

El estudio del operón LH92\_11085-11070 indicó que este podía codificar un sistema de formación de pili tipo chaperona-usher. Además, el análisis estructural de la proteína que codifica el gen LH92\_11085, apuntó a que este gen podía codificar la subunidad mayor del cuerpo del pilus. La delección de este gen del genoma de la cepa MAR002 podría tener como resultado la desaparición de alguno de los pili localizados en la superficie bacteriana de la cepa *A. baumannii* MAR002 ya que no se sintetizarían las subunidades que forman el cuerpo del pilus.

Para estudiar la implicación de este gen en la capacidad de *A. baumannii* MAR002 de formar *biofilm* y adherirse a células epiteliales humanas se fabricó un mutante isogénico de este gen ( $\Delta$ 11085).

Los experimentos de formación de *biofilm* realizados con la cepa de *A. baumannii* MAR002 y su mutante isogénico  $\Delta$ 11085, demostraron que este sistema de formación de pili estaba implicado en la formación del *biofilm* de la cepa MAR002. Se vio que cuando el gen LH92\_11085 era delecionado del genoma de la cepa MAR002, esta reducía su

capacidad de formar de *biofilm* en un 40%. Las imágenes de microscopía electrónica de barrido mostraron la estructura del *biofilm* de MAR002 la cual consistía en una estructura tridimensional muy bien organizada. La cepa mutante mantuvo parcialmente la capacidad de adherirse a la superficie pero fue incapaz de formar esa estructura tan organizada.

Resultados similares se obtuvieron con la cepa de *A. baumannii* 307-0294 y su mutante isogénico de la proteína Bap (proteína asociada al *biofilm*). La familia de proteínas Bap son adhesinas de alto peso molecular localizadas en la superficie bacteriana que confieren a la bacteria la capacidad de formar *biofilm* (208, 209). Este estudio reveló que la proteína Bap de *A. baumannii* parecía estar implicada en el mantenimiento de la estructura del biofilm (130).

Un estudio posterior, mostró que Bap estaba implicada en la adherencia de la cepa 307-0294 a células humanas epiteliales bronquiales y a queratinocitos humanos neonatales (131). Además, la mutación de los genes BLP1 y BLP2 en la cepa AYE, genes relacionadas con Bap, resultó en una reducción de la capacidad de esta cepa de formar *biofilm* y de adherirse a células A549 (132). Al analizar la adherencia de MAR002 y  $\Delta$ 11085 a células eucariotas se vio una reducción significativa en su capacidad de adherirse a las células A549, al igual que ocurría con los mutantes isogénicos de Bap, BLP1 y BLP2 (131, 132). Las imágenes de microscopía de barrido mostraron una visión 3D del proceso de adherencia de MAR002 y su mutante isogénico  $\Delta$ 11085 a las células epiteliales humanas. Las micrografías mostraron células epiteliales A549 seriamente dañadas en ambos casos, con la capa de surfactante muy deteriorada. Sin embargo, el número de bacterias adheridas a las células epiteliales era mucho menor cuando se infectaba con la cepa mutante  $\Delta$ 11085.

En este trabajo se demostró la implicación del gen LH92\_11085, perteneciente al operón LH92\_11070-11085, en la adherencia de la cepa MAR002 a superficies bióticas y abióticas. Esos resultados difieren parcialmente con los observados en el sistema de formación de pili tipo chaperona-usher CsuA/BABCDE de *A. baumannii* ATCC 19606. Este sistema resultó estar involucrado en la adherencia de la bacteria a superficies abióticas

## Discusión

---

(126), siendo la adherencia a superficies bióticas independiente del sistema CsuA/BABCDE (128).

Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión mostraron que la cepa de *A. baumannii* MAR002 tenía en la superficie dos tipos de pili diferentes. Unos pili gruesos de unos 200-300 nm de longitud que rodean a la bacteria formando una especie de corona y unos pili más largos, finos y menos abundantes. El análisis realizado con microscopía electrónica de transmisión de la cepa salvaje MAR002 y su mutante isogénico  $\Delta$ 11085 reveló que, cuando el gen LH92\_11085 era delecionado del genoma, los pili largos desaparecían de la superficie bacteriana. Además, la complementación del gen LH92\_11085 restableció el fenotipo de la cepa salvaje.

Tomaras y colaboradores (126) observaron que cuando se interrumpía el gen *csuE*, el cual codifica una de las subunidades de la punta del pilus, la cepa *A. baumannii* ATCC 19606 no formaba los pili. Al complementar la cepa mutante introduciendo el gen de forma externa en un plásmido este fenotipo se restablecía. La interrupción de una de las subunidades de la punta del pilus inhibió la síntesis completa del pilus. Esto puede deberse a que este sistema Csu está codificado por un operón policistrónico de tal forma que la interrupción de uno de los genes que lo forman impide la expresión o traducción del resto de los genes.

Por último, se evaluó el papel que podría tener este sistema de formación de pili en la virulencia de la cepa *A. baumannii* MAR002. Para ello, utilizamos un modelo de viabilidad celular de células epiteliales humanas. En este modelo se estudia el porcentaje de células muertas tras 24 horas de infección. El porcentaje de células muertas tras ser incubadas con la cepa mutante  $\Delta$ 11085 resultó ser estadísticamente menor en comparación con las células incubadas con la cepa salvaje.

La adherencia de la bacteria a células eucariotas es el primer paso de colonización e infección. De esta forma, si la bacteria pierde la capacidad de adherirse a las células eucariotas también se verá reducida su capacidad de infectarla. Los resultados de microscopía electrónica de barrido mostraron que el número de bacterias adheridas a las

células epiteliales humanas era mucho menor en el caso de la cepa mutante que en la cepa salvaje. Sin embargo, se observó que en ambos casos las células eucariotas estaban dañadas. Todo esto parece indicar que la eliminación de los pili codificados por el operón LH92\_11070-11085 de la superficie de la cepa MAR002 reduce la capacidad de esta cepa de adherirse a las células eucariotas y, por lo tanto, menor es el número de bacterias presentes que podrían causar daño e infectar las células.

Los resultados mostrados en el capítulo II demuestran el papel que el gen LH92\_11085 podría tener en patogenicidad de *A. baumannii* de MAR002 y su valor como posible diana para inhibir las interacciones entre el patógeno y el huésped las cuales son críticas para la virulencia del patógeno.

Tras caracterizar este nuevo factor de virulencia de la cepa *A. baumannii* MAR002 nos interesamos en conocer el conjunto de genes necesarios para desarrollar una infección. El modelo que se escogió para realizar el trabajo fue un modelo de neumonía debido a que es la manifestación clínica más común de la infección por *A. baumannii* (54). Además, se trabajó con la cepa tipo *A. baumannii* ATCC 17978 por ser la cepa de *A. baumannii* más estudiada y se conoce la secuencia de su genoma completo.

Para identificar los genes implicados en el desarrollo de un proceso de neumonía, se obtuvieron los perfiles de expresión génica de la cepa de *A. baumannii* ATCC 17978 presente durante una infección de neumonía de ratón, comparándolos con los perfiles de expresión génica de bacterias cultivadas en un matraz con medio de cultivo. Murray y colaboradores (69) realizaron un estudio similar en el cual describieron el transcriptoma de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978 durante una bacteriemia. En este trabajo se observó que los genes más sobreexpresados durante la infección pertenecían a los tres *clusters* relacionados con sideróforos conocidos de *A. baumannii* ATCC 17978. Estos resultados muestran las condiciones restrictivas de hierro *in vivo*.

Nuestros resultados corroboran estas condiciones limitantes de hierro ya que, entre todos los genes que aparecieron diferencialmente expresados durante la infección, describimos el gen A1S\_0242, el cual codifica una proteína transportadora de hierro

## Discusión

---

ferroso (*ferrous iron transporter protein A*). Se encontró que este gen estaba sobreexpresado 2.67 veces más en células aisladas durante la infección pulmonar con respecto a células cultivadas en matraz.

El hierro es un elemento esencial para el crecimiento de la mayoría de las bacterias y un suministro suficiente de hierro está relacionado con la proliferación, virulencia y persistencia del patógeno (149, 150). La presencia de hierro será determinante en el curso de la infección a favor del patógeno o del huésped. De esta forma, un mecanismo de defensa del huésped frente a la infección consiste en reducir la cantidad de hierro disponible. Para adaptarse a esas condiciones limitantes de hierro, las bacterias han desarrollado múltiples estrategias para captar hierro (149).

En condiciones anaeróbicas y pH neutro, se produce una rápida oxidación del  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$ , compuesto prácticamente inaccesible para los microorganismos. En este punto las bacterias dependen de unos compuestos quelantes, denominados sideróforos, para captar el hierro. El sideróforo más estudiado en *A. baumannii* es la acinetobactina (157, 163, 210, 211), aunque existen estudios en los que se describieron otros sideróforos tales como la fimsbactina A-F (212) o las baumanoferrinas A y B (213), los cuales resultaron estar implicados en la virulencia de *A. baumannii*. Además, existen bacterias capaces de utilizar otras moléculas como quelantes de hierro, un ejemplo es el citrato utilizado por *Pseudomonas aeruginosa* (214).

En condiciones de anaerobiosis, el hierro predomina en la forma soluble  $\text{Fe}^{2+}$ . A diferencia del hierro férrico, el hierro ferroso es capaz de difundir al periplasma a través de porinas de la membrana externa donde puede ser transportado al interior celular a través de diferentes sistemas de transporte como puede ser el sistema Feo (165, 215). El operón *feo* fue descubierto por primera vez en la bacteria *E. coli* K12 y se vio que está compuesto por tres genes: *feoA*, *feoB* y *feoC*.

Prácticamente todas las bacterias utilizan los sistema Feo para captar hierro ferroso de su entorno, que a menudo son nichos biológicos que estabilizan  $\text{Fe}^{2+}$  en relación con  $\text{Fe}^{3+}$ . A pesar de que hay muy poca información sobre el funcionamiento de

estos sistemas de captación de hierro, hay muchos estudios que demuestran su implicación en la virulencia de la bacteria (167, 177, 178, 216, 217).

Teniendo en cuenta la cantidad de estudios que demuestran la implicación de los sistemas Feo en la virulencia de diferentes especies bacterianas, el gen A1S\_0242 fue seleccionado para estudiar su posible implicación en la virulencia de *A. baumannii*.

En primer lugar se estudió el entorno genético de este gen y se vio que pertenece a un operón policistrónico formado por tres genes; el gen A1S\_0242, que codifica una proteína de transporte de hierro ferroso A (*putative ferrous iron transport protein A*), el gen A1S\_0243, que codifica una proteína de transporte de hierro ferroso B (*putative ferrous iron transport protein B*) y el gen A1S\_0244, que codifica una proteína hipotética.

Un análisis más extenso del genoma de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978 reveló la existencia de otros dos genes (A1S\_3850 y A1S\_0652) homólogos al A1S\_0242 que contenían dominios *feoA*. Tras analizar los genomas de las cepas de *A. baumannii* con su genoma completo secuenciado se vio que el gen A1S\_0242 se encuentra muy extendido dentro de la especie mientras que los genes A1S\_3850 y A1S\_0652 no se encuentran en muchas otras cepas. Esto podría justificar que el operón A1S\_0242-0444 fuese el principal sistema Feo dentro en *A. baumannii* ATCC 17978 y esto podría explicar por qué los niveles de expresión de los genes A1S\_3850 y A1S\_0652 no variaron entre células aisladas durante la neumonía con respecto a las células cultivadas en matraz. El análisis del transcriptoma de bacterias aisladas durante una bacteriemia mostró que ambos genes tampoco variaban su expresión cuando se comparaban con el control mientras que el gen A1S\_0242 estaba sobreexpresado (69). Eijkelkamp y colaboradores (162) estudiaron el perfil transcripcional de *A. baumannii* ATCC 17978 bajo condiciones limitantes de hierro. Los resultados mostraron que los genes A1S\_0242 y A1S\_0652 estaban sobreexpresados bajo condiciones limitantes de hierro mientras que el gen A1S\_3850 no variaba su expresión.

Para estudiar la implicación de este gen en el fenotipo de *A. baumannii* ATCC 17978 se construyeron los mutantes isogénicos de los genes A1S\_0242 y A1S\_3850

## Discusión

---

además de un doble mutante de ambos genes. El primer paso consistió en confirmar que, al deletar el gen A1S\_0242, su función no era suplida por los otros dos genes descritos anteriormente. Los experimentos de PCR a tiempo real de los genes A1S\_0652 y A1S\_3850 demostraron que la expresión de estos genes no variaba entre la cepa ATCC 17978 salvaje y la cepa mutante. De esta forma, el cambio de fenotipo de la cepa mutante frente a la cepa salvaje se podría relacionar directamente con la delección del gen A1S\_0242.

Se analizó la implicación del gen *feoA* sobre la eficacia biológica de la bacteria. Los resultados mostraron que el mutante isogénico  $\Delta 0242$  tenía una tasa de crecimiento menor que la cepa salvaje. Se vio que la cepa mutante  $\Delta 3850$  no variaba su tasa de crecimiento con respecto a la cepa salvaje mientras que el doble mutante tenía la misma tasa de crecimiento que el mutante del gen A1S\_0242. Debido a que el hierro es un elemento esencial para el crecimiento de la bacteria es de esperar que la inactivación de un sistema de captación de hierro resulte en una reducción de la tasa de crecimiento.

La capacidad de formar *biofilm* y de adherirse a células epiteliales humanas de la cepa ATCC 17978 se vio muy afectada cuando se deletó el gen A1S\_0242. Hay estudios que demuestran que la homeostasis del hierro es importante para la interacción de la bacteria con el huésped. Zimbley y colaboradores (218) demostraron que la proteína TonB2, proteína necesaria para la captación de hierro, es necesaria para la adherencia de *A. baumannii* a la fibronectina y a células epiteliales. Tanto la formación de biofilm como la adherencia a células eucariotas humanas son mecanismos utilizados por la bacteria para colonizar el huésped y ambos se vieron afectados por la delección del gen A1S\_0242.

Los análisis de sensibilidad al estrés oxidativo mostraron que cuando se deletó el gen A1S\_0242 del genoma de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978 se redujo la resistencia de la bacteria al estrés oxidativo. La superóxido dismutasa tiene un papel muy importante en el metabolismo del superóxido, evitando la formación de especies reactivas del oxígeno. Sabiendo que la superóxido dismutasa necesita hierro como cofactor para catalizar la reacción de dismutación (219) es de esperar que una reducción



en la captación de hierro provocaría una disminución en su actividad y por lo tanto la bacteria sería más sensible a las especies reactivas del oxígeno. Los resultados de sensibilidad al estrés oxidativo obtenidos demostraron mostraron que la cepa mutante  $\Delta 0242$  es más sensible al estrés oxidativo causado por el paraquat.

La delección del gen A1S\_3850 no modificó la capacidad de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978 de formar biofilm, de adherirse a células epiteliales humanas o de resistir al estrés oxidativo. Todos estos resultados confirman el papel irrelevante del gen A1S\_3850.

Los resultados obtenidos demuestran la implicación del gen *feoA* en la eficacia biológica de la cepa ATCC 17978 cuando hay limitación de hierro. Además, la virulencia *in vitro* de la cepa mutante también se redujo, tal como demuestran los experimentos de formación de biofilm, de adherencia a células epiteliales humanas y de resistencia al estrés oxidativo estando estos procesos implicados en la patogenicidad de *A. baumannii*.

Para ver el efecto de la delección del gen sobre la virulencia *in vivo* de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978 se realizaron dos experimentos con modelos animales. El primero consistió en una infección de larvas de *Galleria mellonella* con las cepas ATCC 17978 y su mutante isogénico  $\Delta 0242$ . La delección del gen A1S\_0242 provocó la reducción de la capacidad de *A. baumannii* de infectar y de matar las larvas. Una vez más, la infección con la cepa mutante del gen A1S\_3850 no mostró cambios con respecto a la cepa salvaje. Estos resultados se corroboraron con los obtenidos en un modelo de infección de neumonía en ratones, en el cual los ratones infectados con el mutante  $\Delta 0242$  tuvieron una tasa de supervivencia mayor que los infectados con la cepa salvaje.

Un estudio reciente describió una serie de genes necesarios para la supervivencia bacteriana durante una infección. Se observó que la mutación del gen *feoB* de *A. baumannii* provocaba una reducción en la eficacia biológica de la bacteria durante la bacteriemia. Experimentos *in vitro* demostraron que la inactivación del gen *feoB* provocaba la disminución en la supervivencia de la bacteria en suero humano y dentro de macrófagos (184).

## Discusión

---

La mutación del gen *feoA* provocó el aumento de la dosis letal de la bacteria y el aumento en la supervivencia de larvas de *G. mellonella* y de ratón. Estos aumentos podrían ser debidos a una sinergia entre dos aspectos: la pérdida de eficacia biológica y el descenso en la virulencia de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978.

Analizando el conjunto de todos los resultados se puede concluir que el gen A1S\_0242 de *A. baumannii* ATCC 17978, implicado en un proceso de captación de hierro, está involucrado en la eficacia biológica, la formación de *biofilm*, la adherencia a células eucariotas y la resistencia al estrés oxidativo. Este gen está implicado en la virulencia de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978.

## **CONCLUSIONES**



## V. CONCLUSIONES

1. El genoma de la cepa *A. baumannii* MAR002 tiene un tamaño de 3.72 Mb y un contenido de G+C de 38.92%.
2. El genoma de la cepa *A. baumannii* MAR002 contiene 3,300 secuencias codificantes, 75 pseudogenes, 69 ARNt y 6 *clusters* de ARNr.
3. La cepa *A. baumannii* MAR002 tiene una capacidad extraordinaria de adherirse a superficies bióticas y abióticas y de formar *biofilm*.
4. El gen LH92\_11085 de la cepa *A. baumannii* MAR002 forma parte de un operón policistrónico funcional que codifica un sistema de formación de pili tipo chaperona-usher.
5. El gen LH92\_11085 de la cepa *A. baumannii* MAR002 está implicado en la formación del *biofilm* maduro y en la adherencia a células epiteliales humanas.
6. El gen LH92\_11085 está implicado en la virulencia *in vivo* de la cepa *A. baumannii* MAR002.
7. El gen *feoA* forma parte de un operón policistrónico involucrado en la captación de hierro.
8. El gen *feoA* de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978 está implicado en la eficacia biológica y en la resistencia al estrés oxidativo de la bacteria, así como en la capacidad de formación de *biofilm* y de adherirse a células epiteliales humanas.
9. El gen *feoA* juega un papel importante en la virulencia *in vivo* de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978.



## **BIBLIOGRAFÍA**





## VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol*. 2007 Dec;5(12):939-51.
2. Beijerinck M. Pigmenten als oxydatieproducten gevormd door bacterien. *Versl Koninklijke Akad Wetensch Amsterdam*. 1911;19:1092–103.
3. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev*. 2008 Jul;21(3):538-82.
4. Brisou J, Prevot AR. [Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under *Acromobacter* group]. *Ann Inst Pasteur (Paris)*. 1954 Jun;86(6):722-8.
5. Baumann P, Doudoroff M, Stanier RY. A study of the *Moraxella* group. II. Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). *J Bacteriol*. 1968 May;95(5):1520-41.
6. Lessel E. Subcommittee on nomenclature of *Moraxella* and allied bacteria. *Int J Syst Bacteriol*. 1971;21:213-4.
7. Jung J, Park W. *Acinetobacter* species as model microorganisms in environmental microbiology: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015 Mar;99(6):2533-48.
8. Bergogne-Berezin E, Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev*. 1996 Apr;9(2):148-65.
9. Rossau R vLA, Gillis M, de Ley J. Taxonomy of *Moraxellaceae* fam. nov., a new bacterial family to accommodate the genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and related organisms. *Int J Syst Bacteriol*. 1991;41:310-9.
10. Bouvet PJ GP. Taxonomy of the Genus *Acinetobacter* with the Recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov. *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov. *Acinetobacter*

# Bibliografía

---

johnsonii sp. nov. and *Acinetobacter junii* sp. nov. and Emended Descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwofii* Int J Syst Bacteriol. 1986;36: 228-40.

11. Gerner-Smidt P. Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. J Clin Microbiol. 1992 Oct;30(10):2680-5.

12. Nemec A, Krizova L, Maixnerova M, van der Reijden TJ, Deschaght P, Passet V, et al. Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). Res Microbiol. 2011 May;162(4):393-404.

13. Gerner-Smidt P, Tjernberg I, Ursing J. Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. J Clin Microbiol. 1991 Feb;29(2):277-82.

14. Nemec A, Krizova L, Maixnerova M, Sedo O, Brisse S, Higgins PG. *Acinetobacter seifertii* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex isolated from human clinical specimens. Int J Syst Evol Microbiol. 2015 Mar;65(Pt 3):934-42.

15. Cosgaya C, Mari-Almirall M, Van Assche A, Fernandez-Orth D, Mosqueda N, Telli M, et al. *Acinetobacter dijkshoorniae* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex mainly recovered from clinical samples in different countries. Int J Syst Evol Microbiol. 2016 Oct;66(10):4105-11.

16. Merino M, Poza M, Roca I, Barba MJ, Sousa MD, Vila J, et al. Nosocomial outbreak of a multiresistant *Acinetobacter baumannii* expressing OXA-23 carbapenemase in Spain. Microb Drug Resist. 2014 Aug;20(4):259-63.

17. del Mar Tomas M, Cartelle M, Pertega S, Beceiro A, Llinares P, Canle D, et al. Hospital outbreak caused by a carbapenem-resistant strain of *Acinetobacter*

baumannii: patient prognosis and risk-factors for colonisation and infection. Clin Microbiol Infect. 2005 Jul;11(7):540-6.

18. Chusri S, Chongsuivatwong V, Rivera JI, Silpapojakul K, Singkhamanan K, McNeil E, et al. Clinical outcomes of hospital-acquired infection with *Acinetobacter nosocomialis* and *Acinetobacter pittii*. Antimicrob Agents Chemother. 2014 Jul;58(7):4172-9.

19. Lai CC, Hsu HL, Tan CK, Tsai HY, Cheng A, Liu CY, et al. Recurrent bacteremia caused by the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. J Clin Microbiol. 2012 Sep;50(9):2982-6.

20. Schleicher X, Higgins PG, Wisplinghoff H, Korber-Irrgang B, Kresken M, Seifert H. Molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter nosocomialis* in Germany over a 5-year period (2005-2009). Clin Microbiol Infect. 2013 Aug;19(8):737-42.

21. Karah N, Haldorsen B, Hegstad K, Simonsen GS, Sundsfjord A, Samuelsen O. Species identification and molecular characterization of *Acinetobacter* spp. blood culture isolates from Norway. J Antimicrob Chemother. 2011 Apr;66(4):738-44.

22. Yang J, Chen Y, Jia X, Luo Y, Song Q, Zhao W, et al. Dissemination and characterization of NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* in an intensive care unit in China. Clin Microbiol Infect. 2012 Dec;18(12):E506-13.

23. Mostachio AK, Levin AS, Rizek C, Rossi F, Zerbini J, Costa SF. High prevalence of OXA-143 and alteration of outer membrane proteins in carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. isolates in Brazil. Int J Antimicrob Agents. 2012 May;39(5):396-401.

24. Li P, Yang C, Xie J, Liu N, Wang H, Zhang L, et al. *Acinetobacter calcoaceticus* from a fatal case of pneumonia harboring bla(NDM-1) on a widely distributed plasmid. BMC Infect Dis. 2015 Mar 18;15:131.

## Bibliografía

---

25. Lin YC, Sheng WH, Chang SC, Wang JT, Chen YC, Wu RJ, et al. Application of a microsphere-based array for rapid identification of *Acinetobacter* spp. with distinct antimicrobial susceptibilities. *J Clin Microbiol.* 2008 Feb;46(2):612-7.
26. Bouvet PJ, Grimont PA. Identification and biotyping of clinical isolates of *Acinetobacter*. *Ann Inst Pasteur Microbiol.* 1987 Sep-Oct;138(5):569-78.
27. Vaneechoutte M, Dijkshoorn L, Tjernberg I, Elaichouni A, de Vos P, Claeys G, et al. Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *J Clin Microbiol.* 1995 Jan;33(1):11-5.
28. Janssen P, Maquelin K, Coopman R, Tjernberg I, Bouvet P, Kersters K, et al. Discrimination of *Acinetobacter* genomic species by AFLP fingerprinting. *Int J Syst Bacteriol.* 1997 Oct;47(4):1179-87.
29. Ehrenstein B, Bernards AT, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Towner KJ, Bouvet PJ, et al. *Acinetobacter* species identification by using tRNA spacer fingerprinting. *J Clin Microbiol.* 1996 Oct;34(10):2414-20.
30. Dolzani L, Tonin E, Lagatolla C, Prandin L, Monti-Bragadin C. Identification of *Acinetobacter* isolates in the *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex by restriction analysis of the 16S-23S rRNA intergenic-spacer sequences. *J Clin Microbiol.* 1995 May;33(5):1108-13.
31. Chang HC, Wei YF, Dijkshoorn L, Vaneechoutte M, Tang CT, Chang TC. Species-level identification of isolates of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex by sequence analysis of the 16S-23S rRNA gene spacer region. *J Clin Microbiol.* 2005 Apr;43(4):1632-9.
32. La Scola B, Gundi VA, Khamis A, Raoult D. Sequencing of the *rpoB* gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter* species. *J Clin Microbiol.* 2006 Mar;44(3):827-32.

33. Ecker JA, Massire C, Hall TA, Ranken R, Pennella TT, Agasino Ivy C, et al. Identification of *Acinetobacter* species and genotyping of *Acinetobacter baumannii* by multilocus PCR and mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2006 Aug;44(8):2921-32.
34. Higgins PG, Wisplinghoff H, Krut O, Seifert H. A PCR-based method to differentiate between *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomic species 13TU. *Clin Microbiol Infect*. 2007 Dec;13(12):1199-201.
35. Espinal P, Seifert H, Dijkshoorn L, Vila J, Roca I. Rapid and accurate identification of genomic species from the *Acinetobacter baumannii* (Ab) group by MALDI-TOF MS. *Clin Microbiol Infect*. 2012 Nov;18(11):1097-103.
36. Mari-Almirall M, Cosgaya C, Higgins PG, Van Assche A, Telli M, Huys G, et al. MALDI-TOF/MS identification of species from the *Acinetobacter baumannii* (Ab) group revisited: inclusion of the novel *A. seifertii* and *A. dijkshoorniae* species. *Clin Microbiol Infect*. 2017 Mar;23(3):210 e1- e9.
37. Ahmed SS, Alp E. Genotyping methods for monitoring the epidemic evolution of *A. baumannii* strains. *J Infect Dev Ctries*. 2015 Apr 15;9(4):347-54.
38. Bernardis AT, van der Toorn J, van Boven CP, Dijkshoorn L. Evaluation of the ability of a commercial system to identify *Acinetobacter* genomic species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1996 Apr;15(4):303-8.
39. Seifert H, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Pelzer N, Tjernberg I, Vaneechoutte M. Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *J Clin Microbiol*. 1997 Nov;35(11):2819-25.
40. Baumann P. Isolation of *Acinetobacter* from soil and water. *J Bacteriol*. 1968 Jul;96(1):39-42.
41. Towner KJ. *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. *J Hosp Infect*. 2009 Dec;73(4):355-63.

## Bibliografía

---

42. Al Atrouni A, Joly-Guillou ML, Hamze M, Kempf M. Reservoirs of Non-baumannii *Acinetobacter* Species. *Front Microbiol.* 2016;7:49.
43. (CDC) CfDCaP. *Acinetobacter baumannii* infections among patients at military medical facilities treating injured U.S. service members, 2002-2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2004 Nov 19;53(45):1063-6.
44. Wong TH, Tan BH, Ling ML, Song C. Multi-resistant *Acinetobacter baumannii* on a burns unit--clinical risk factors and prognosis. *Burns.* 2002 Jun;28(4):349-57.
45. Roberts SA, Findlay R, Lang SD. Investigation of an outbreak of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* in an intensive care burns unit. *J Hosp Infect.* 2001 Jul;48(3):228-32.
46. Cartelle Gestal M, Zurita J, Gualpa G, Gonzalez C, Paz YMA. Early detection and control of an *Acinetobacter baumannii* multi-resistant outbreak in a hospital in Quito, Ecuador. *J Infect Dev Ctries.* 2016 Dec 30;10(12):1294-8.
47. Roca I, Espinal P, Vila-Farres X, Vila J. The *Acinetobacter baumannii* Oxymoron: Commensal Hospital Dweller Turned Pan-Drug-Resistant Menace. *Front Microbiol.* 2012;3:148.
48. Talbot GH, Bradley J, Edwards JE, Jr., Gilbert D, Scheld M, Bartlett JG. Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2006 Mar 01;42(5):657-68.
49. Spellberg B, Guidos R, Gilbert D, Bradley J, Boucher HW, Scheld WM, et al. The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2008 Jan 15;46(2):155-64.

50. Rice LB. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *J Infect Dis.* 2008 Apr 15;197(8):1079-81.
51. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2009 Jan 01;48(1):1-12.
52. World Health Organization. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. [http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short\\_Summary\\_25Feb-ET\\_NM\\_WHO.pdf](http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf) 2017.
53. Cisneros JM, Pachon J. [Acinetobacter baumannii: a nosocomial pathogen difficult to control]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2003 May;21(5):221-3.
54. Garnacho J, Sole-Violan J, Sa-Borges M, Diaz E, Rello J. Clinical impact of pneumonia caused by Acinetobacter baumannii in intubated patients: a matched cohort study. *Crit Care Med.* 2003 Oct;31(10):2478-82.
55. Seifert H, Strate A, Pulverer G. Nosocomial bacteremia due to Acinetobacter baumannii. Clinical features, epidemiology, and predictors of mortality. *Medicine (Baltimore).* 1995 Nov;74(6):340-9.
56. McConnell MJ, Actis L, Pachon J. Acinetobacter baumannii: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiol Rev.* 2013 Mar;37(2):130-55.
57. Wroblewska MM, Dijkshoorn L, Marchel H, van den Barselaar M, Swoboda-Kopec E, van den Broek PJ, et al. Outbreak of nosocomial meningitis caused by Acinetobacter baumannii in neurosurgical patients. *J Hosp Infect.* 2004 Aug;57(4):300-7.
58. Kendirli T, Aydin HI, Hacıhamdioglu D, Gulgun M, Unay B, Akin R, et al. Meningitis with multidrug-resistant Acinetobacter baumannii treated with ampicillin/sulbactam. *J Hosp Infect.* 2004 Apr;56(4):328.

# Bibliografía

---

59. Hawkey PM. The origins and molecular basis of antibiotic resistance. *BMJ*. 1998 Sep 05;317(7159):657-60.
60. Lin MF, Lan CY. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From bench to bedside. *World J Clin Cases*. 2014 Dec 16;2(12):787-814.
61. Valencia R, Arroyo LA, Conde M, Aldana JM, Torres MJ, Fernandez-Cuenca F, et al. Nosocomial outbreak of infection with pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care university hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2009 Mar;30(3):257-63.
62. Vila J, Pachon J. Therapeutic options for *Acinetobacter baumannii* infections. *Expert Opin Pharmacother*. 2008 Mar;9(4):587-99.
63. Fournier PE, Vallenet D, Barbe V, Audic S, Ogata H, Poirel L, et al. Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Genet*. 2006 Jan;2(1):e7.
64. Snitkin ES, Zelazny AM, Montero CI, Stock F, Mijares L, Murray PR, et al. Genome-wide recombination drives diversification of epidemic strains of *Acinetobacter baumannii*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Aug 16;108(33):13758-63.
65. Vila J, Pachon J. Therapeutic options for *Acinetobacter baumannii* infections: an update. *Expert Opin Pharmacother*. 2012 Nov;13(16):2319-36.
66. Tankovic J, Legrand P, De Gatines G, Chemineau V, Brun-Buisson C, Duval J. Characterization of a hospital outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* by phenotypic and genotypic typing methods. *J Clin Microbiol*. 1994 Nov;32(11):2677-81.
67. Beceiro A, Tomas M, Bou G. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? *Clin Microbiol Rev*. 2013 Apr;26(2):185-230.



68. Mendez JA, Mateos J, Beceiro A, Lopez M, Tomas M, Poza M, et al. Quantitative proteomic analysis of host--pathogen interactions: a study of *Acinetobacter baumannii* responses to host airways. *BMC Genomics*. 2015 May 30;16:422.
69. Murray GL, Tsyganov K, Kostoulis XP, Bulach DM, Powell D, Creek DJ, et al. Global Gene Expression Profile of *Acinetobacter baumannii* During Bacteremia. *J Infect Dis*. 2017 Feb 15;215(suppl\_1):S52-S7.
70. Lee CR, Lee JH, Park M, Park KS, Bae IK, Kim YB, et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7:55.
71. Choi CH, Lee EY, Lee YC, Park TI, Kim HJ, Hyun SH, et al. Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. *Cell Microbiol*. 2005 Aug;7(8):1127-38.
72. Kim SW, Choi CH, Moon DC, Jin JS, Lee JH, Shin JH, et al. Serum resistance of *Acinetobacter baumannii* through the binding of factor H to outer membrane proteins. *FEMS Microbiol Lett*. 2009 Dec;301(2):224-31.
73. Moon DC, Choi CH, Lee JH, Choi CW, Kim HY, Park JS, et al. *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A modulates the biogenesis of outer membrane vesicles. *J Microbiol*. 2012 Feb;50(1):155-60.
74. Jin JS, Kwon SO, Moon DC, Gurung M, Lee JH, Kim SI, et al. *Acinetobacter baumannii* secretes cytotoxic outer membrane protein A via outer membrane vesicles. *PLoS One*. 2011 Feb 28;6(2):e17027.
75. Smani Y, Dominguez-Herrera J, Pachon J. Association of the outer membrane protein Omp33 with fitness and virulence of *Acinetobacter baumannii*. *J Infect Dis*. 2013 Nov 15;208(10):1561-70.
76. Rumbo C, Tomas M, Fernandez Moreira E, Soares NC, Carvajal M, Santillana E, et al. The *Acinetobacter baumannii* Omp33-36 porin is a virulence factor

## Bibliografía

---

that induces apoptosis and modulates autophagy in human cells. *Infect Immun.* 2014 Nov;82(11):4666-80.

77. Lee CR, Lee JH, Jeong BC, Lee SH. Lipid a biosynthesis of multidrug-resistant pathogens - a novel drug target. *Curr Pharm Des.* 2013;19(36):6534-50.

78. Lopez-Rojas R, Dominguez-Herrera J, McConnell MJ, Docobo-Perez F, Smani Y, Fernandez-Reyes M, et al. Impaired virulence and in vivo fitness of colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Infect Dis.* 2011 Feb 15;203(4):545-8.

79. Lopez-Rojas R, McConnell MJ, Jimenez-Mejias ME, Dominguez-Herrera J, Fernandez-Cuenca F, Pachon J. Colistin resistance in a clinical *Acinetobacter baumannii* strain appearing after colistin treatment: effect on virulence and bacterial fitness. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Sep;57(9):4587-9.

80. Hraiech S, Roch A, Lepidi H, Atieh T, Audoly G, Rolain JM, et al. Impaired virulence and fitness of a colistin-resistant clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* in a rat model of pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Oct;57(10):5120-1.

81. Luke NR, Sauberan SL, Russo TA, Beanan JM, Olson R, Loehfelm TW, et al. Identification and characterization of a glycosyltransferase involved in *Acinetobacter baumannii* lipopolysaccharide core biosynthesis. *Infect Immun.* 2010 May;78(5):2017-23.

82. Lin L, Tan B, Pantapalangkoor P, Ho T, Baquir B, Tomaras A, et al. Inhibition of LpxC protects mice from resistant *Acinetobacter baumannii* by modulating inflammation and enhancing phagocytosis. *MBio.* 2012;3(5).

83. Beceiro A, Moreno A, Fernandez N, Vallejo JA, Aranda J, Adler B, et al. Biological cost of different mechanisms of colistin resistance and their impact on virulence in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(1):518-26.

84. Russo TA, Luke NR, Beanan JM, Olson R, Sauberan SL, MacDonald U, et al. The K1 capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* strain 307-0294 is a major virulence factor. *Infect Immun.* 2010 Sep;78(9):3993-4000.

85. Lees-Miller RG, Iwashkiw JA, Scott NE, Seper A, Vinogradov E, Schild S, et al. A common pathway for O-linked protein-glycosylation and synthesis of capsule in *Acinetobacter baumannii*. *Mol Microbiol*. 2013 Sep;89(5):816-30.
86. Geisinger E, Isberg RR. Antibiotic modulation of capsular exopolysaccharide and virulence in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Pathog*. 2015 Feb;11(2):e1004691.
87. Camarena L, Bruno V, Euskirchen G, Poggio S, Snyder M. Molecular mechanisms of ethanol-induced pathogenesis revealed by RNA-sequencing. *PLoS Pathog*. 2010 Apr 01;6(4):e1000834.
88. Fiester SE, Arivett BA, Schmidt RE, Beckett AC, Ticak T, Carrier MV, et al. Iron-Regulated Phospholipase C Activity Contributes to the Cytolytic Activity and Virulence of *Acinetobacter baumannii*. *PLoS One*. 2016;11(11):e0167068.
89. Jacobs AC, Hood I, Boyd KL, Olson PD, Morrison JM, Carson S, et al. Inactivation of phospholipase D diminishes *Acinetobacter baumannii* pathogenesis. *Infect Immun*. 2010 May;78(5):1952-62.
90. Stahl J, Bergmann H, Gottig S, Ebersberger I, Averhoff B. *Acinetobacter baumannii* Virulence Is Mediated by the Concerted Action of Three Phospholipases D. *PLoS One*. 2015;10(9):e0138360.
91. Ellis TN, Kuehn MJ. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2010 Mar;74(1):81-94.
92. Mendez JA, Soares NC, Mateos J, Gayoso C, Rumbo C, Aranda J, et al. Extracellular proteome of a highly invasive multidrug-resistant clinical strain of *Acinetobacter baumannii*. *J Proteome Res*. 2012 Dec 07;11(12):5678-94.
93. Jun SH, Lee JH, Kim BR, Kim SI, Park TI, Lee JC, et al. *Acinetobacter baumannii* outer membrane vesicles elicit a potent innate immune response via membrane proteins. *PLoS One*. 2013;8(8):e71751.

# Bibliografía

---

94. McConnell MJ, Rumbo C, Bou G, Pachon J. Outer membrane vesicles as an acellular vaccine against *Acinetobacter baumannii*. *Vaccine*. 2011 Aug 05;29(34):5705-10.
95. Russo TA, MacDonald U, Beanan JM, Olson R, MacDonald IJ, Sauberman SL, et al. Penicillin-binding protein 7/8 contributes to the survival of *Acinetobacter baumannii* in vitro and in vivo. *J Infect Dis*. 2009 Feb 15;199(4):513-21.
96. Korotkov KV, Sandkvist M, Hol WG. The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Nat Rev Microbiol*. 2012 Apr 02;10(5):336-51.
97. Johnson TL, Waack U, Smith S, Mobley H, Sandkvist M. *Acinetobacter baumannii* Is Dependent on the Type II Secretion System and Its Substrate LipA for Lipid Utilization and In Vivo Fitness. *J Bacteriol*. 2015 Dec 14;198(4):711-9.
98. Repizo GD, Gagne S, Foucault-Grunenwald ML, Borges V, Charpentier X, Limansky AS, et al. Differential Role of the T6SS in *Acinetobacter baumannii* Virulence. *PLoS One*. 2015;10(9):e0138265.
99. Bentancor LV, Camacho-Peiro A, Bozkurt-Guzel C, Pier GB, Maira-Litran T. Identification of Ata, a multifunctional trimeric autotransporter of *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol*. 2012 Aug;194(15):3950-60.
100. Henrichsen J, Blom J. Correlation between twitching motility and possession of polar fimbriae in *Acinetobacter calcoaceticus*. *Acta Pathol Microbiol Scand B*. 1975 Apr;83(2):103-15.
101. Harding CM, Tracy EN, Carruthers MD, Rather PN, Actis LA, Munson RS, Jr. *Acinetobacter baumannii* strain M2 produces type IV pili which play a role in natural transformation and twitching motility but not surface-associated motility. *MBio*. 2013 Aug 06;4(4).

102. Eijkelkamp BA, Stroehler UH, Hassan KA, Papadimitriou MS, Paulsen IT, Brown MH. Adherence and motility characteristics of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. *FEMS Microbiol Lett.* 2011 Oct;323(1):44-51.
103. Clemmer KM, Bonomo RA, Rather PN. Genetic analysis of surface motility in *Acinetobacter baumannii*. *Microbiology.* 2011 Sep;157(Pt 9):2534-44.
104. Romero M, Acuna L, Otero A. Patents on quorum quenching: interfering with bacterial communication as a strategy to fight infections. *Recent Pat Biotechnol.* 2012 Apr;6(1):2-12.
105. Luo LM, Wu LJ, Xiao YL, Zhao D, Chen ZX, Kang M, et al. Enhancing pili assembly and biofilm formation in *Acinetobacter baumannii* ATCC19606 using non-native acyl-homoserine lactones. *BMC Microbiol.* 2015 Mar 07;15:62.
106. Mussi MA, Gaddy JA, Cabruja M, Arivett BA, Viale AM, Rasia R, et al. The opportunistic human pathogen *Acinetobacter baumannii* senses and responds to light. *J Bacteriol.* 2010 Dec;192(24):6336-45.
107. McQueary CN, Kirkup BC, Si Y, Barlow M, Actis LA, Craft DW, et al. Extracellular stress and lipopolysaccharide modulate *Acinetobacter baumannii* surface-associated motility. *J Microbiol.* 2012 Jun;50(3):434-43.
108. Rodriguez-Bano J, Marti S, Soto S, Fernandez-Cuenca F, Cisneros JM, Pachon J, et al. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: associated features and clinical implications. *Clin Microbiol Infect.* 2008 Mar;14(3):276-8.
109. Villegas MV, Hartstein AI. *Acinetobacter* outbreaks, 1977-2000. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2003 Apr;24(4):284-95.
110. Lee JC, Koerten H, van den Broek P, Beekhuizen H, Wolterbeek R, van den Barselaar M, et al. Adherence of *Acinetobacter baumannii* strains to human bronchial epithelial cells. *Res Microbiol.* 2006 May;157(4):360-6.

# Bibliografía

---

111. Costerton JW. Introduction to biofilm. *Int J Antimicrob Agents*. 1999 May;11(3-4):217-21; discussion 37-9.
112. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999 May 21;284(5418):1318-22.
113. Otto M. Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annu Rev Med*. 2013;64:175-88.
114. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol*. 2000;54:49-79.
115. McQueary CN, Actis LA. *Acinetobacter baumannii* biofilms: variations among strains and correlations with other cell properties. *J Microbiol*. 2011 Apr;49(2):243-50.
116. Marti S, Rodriguez-Bano J, Catel-Ferreira M, Jouenne T, Vila J, Seifert H, et al. Biofilm formation at the solid-liquid and air-liquid interfaces by *Acinetobacter* species. *BMC Res Notes*. 2011 Jan 11;4:5.
117. Gaddy JA, Actis LA. Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Future Microbiol*. 2009 Apr;4(3):273-8.
118. Gonzalez RH, Nusblat A, Nudel BC. Detection and characterization of quorum sensing signal molecules in *Acinetobacter* strains. *Microbiol Res*. 2001 Mar;155(4):271-7.
119. Stanley NR, Lazizzera BA. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Mol Microbiol*. 2004 May;52(4):917-24.
120. Cabral MP, Soares NC, Aranda J, Parreira JR, Rumbo C, Poza M, et al. Proteomic and functional analyses reveal a unique lifestyle for *Acinetobacter baumannii* biofilms and a key role for histidine metabolism. *J Proteome Res*. 2011 Aug 05;10(8):3399-417.

121. Rumbo-Feal S, Gomez MJ, Gayoso C, Alvarez-Fraga L, Cabral MP, Aransay AM, et al. Whole transcriptome analysis of *Acinetobacter baumannii* assessed by RNA-sequencing reveals different mRNA expression profiles in biofilm compared to planktonic cells. *PLoS One*. 2013;8(8):e72968.
122. Alvarez-Fraga L, Rumbo-Feal S, Perez A, Gomez MJ, Gayoso C, Vallejo JA, et al. Global assessment of small RNAs reveals a non-coding transcript involved in biofilm formation and attachment in *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978. *PLoS One*. 2017;12(8):e0182084.
123. Longo F, Vuotto C, Donelli G. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. *New Microbiol*. 2014 Apr;37(2):119-27.
124. Busch A, Waksman G. Chaperone-usher pathways: diversity and pilus assembly mechanism. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2012 Apr 19;367(1592):1112-22.
125. Hospenthal MK, Redzej A, Dodson K, Ukleja M, Frenz B, Rodrigues C, et al. Structure of a Chaperone-Usher Pilus Reveals the Molecular Basis of Rod Uncoiling. *Cell*. 2016 Jan 14;164(1-2):269-78.
126. Tomaras AP, Dorsey CW, Edelman RE, Actis LA. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology*. 2003 Dec;149(Pt 12):3473-84.
127. Tomaras AP, Flagler MJ, Dorsey CW, Gaddy JA, Actis LA. Characterization of a two-component regulatory system from *Acinetobacter baumannii* that controls biofilm formation and cellular morphology. *Microbiology*. 2008 Nov;154(Pt 11):3398-409.
128. de Breij A, Gaddy J, van der Meer J, Koning R, Koster A, van den Broek P, et al. CsuA/BABCDE-dependent pili are not involved in the adherence of *Acinetobacter baumannii* ATCC19606(T) to human airway epithelial cells and their inflammatory response. *Res Microbiol*. 2009 Apr;160(3):213-8.

## Bibliografía

---

129. Nait Chabane Y, Marti S, Rihouey C, Alexandre S, Hardouin J, Lesouhaitier O, et al. Characterisation of pellicles formed by *Acinetobacter baumannii* at the air-liquid interface. *PLoS One*. 2014;9(10):e111660.
130. Loehfelm TW, Luke NR, Campagnari AA. Identification and characterization of an *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein. *J Bacteriol*. 2008 Feb;190(3):1036-44.
131. Brossard KA, Campagnari AA. The *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein plays a role in adherence to human epithelial cells. *Infect Immun*. 2012 Jan;80(1):228-33.
132. De Gregorio E, Del Franco M, Martinucci M, Roscetto E, Zarrilli R, Di Nocera PP. Biofilm-associated proteins: news from *Acinetobacter*. *BMC Genomics*. 2015 Nov 14;16:933.
133. Gaddy JA, Tomaras AP, Actis LA. The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells. *Infect Immun*. 2009 Aug;77(8):3150-60.
134. Choi CH, Lee JS, Lee YC, Park TI, Lee JC. *Acinetobacter baumannii* invades epithelial cells and outer membrane protein A mediates interactions with epithelial cells. *BMC Microbiol*. 2008 Dec 10;8:216.
135. Smani Y, McConnell MJ, Pachon J. Role of fibronectin in the adhesion of *Acinetobacter baumannii* to host cells. *PLoS One*. 2012;7(4):e33073.
136. Wang N, Ozer EA, Mandel MJ, Hauser AR. Genome-wide identification of *Acinetobacter baumannii* genes necessary for persistence in the lung. *MBio*. 2014 Jun 03;5(3):e01163-14.
137. Kropec A, Maira-Litran T, Jefferson KK, Grout M, Cramton SE, Gotz F, et al. Poly-N-acetylglucosamine production in *Staphylococcus aureus* is essential for virulence in murine models of systemic infection. *Infect Immun*. 2005 Oct;73(10):6868-76.



138. Choi AH, Slamti L, Avci FY, Pier GB, Maira-Litran T. The pgaABCD locus of *Acinetobacter baumannii* encodes the production of poly-beta-1-6-N-acetylglucosamine, which is critical for biofilm formation. *J Bacteriol.* 2009 Oct;191(19):5953-63.
139. Iwashkiw JA, Seper A, Weber BS, Scott NE, Vinogradov E, Stratilo C, et al. Identification of a general O-linked protein glycosylation system in *Acinetobacter baumannii* and its role in virulence and biofilm formation. *PLoS Pathog.* 2012;8(6):e1002758.
140. Henderson IR, Navarro-Garcia F, Desvaux M, Fernandez RC, Ala'Aldeen D. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004 Dec;68(4):692-744.
141. Darvish Alipour Astaneh S, Rasooli I, Mousavi Gargari SL. The role of filamentous hemagglutinin adhesin in adherence and biofilm formation in *Acinetobacter baumannii* ATCC19606(T). *Microb Pathog.* 2014 Sep;74:42-9.
142. Perez A, Merino M, Rumbo-Feal S, Alvarez-Fraga L, Vallejo JA, Beceiro A, et al. The FhaB/FhaC two-partner secretion system is involved in adhesion of *Acinetobacter baumannii* AbH12O-A2 strain. *Virulence.* 2017 Aug 18;8(6):959-74.
143. Kentache T, Ben Abdelkrim A, Jouenne T, De E, Hardouin J. Global Dynamic Proteome Study of a Pellicle-forming *Acinetobacter baumannii* Strain. *Mol Cell Proteomics.* 2017 Jan;16(1):100-12.
144. Rumbo-Feal S, Perez A, Ramelot TA, Alvarez-Fraga L, Vallejo JA, Beceiro A, et al. Contribution of the *A. baumannii* A1S\_0114 Gene to the Interaction with Eukaryotic Cells and Virulence. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:108.
145. Giles SK, Stroehler UH, Eijkelkamp BA, Brown MH. Identification of genes essential for pellicle formation in *Acinetobacter baumannii*. *BMC Microbiol.* 2015 Jun 06;15:116.

# Bibliografía

---

146. Niu C, Clemmer KM, Bonomo RA, Rather PN. Isolation and characterization of an autoinducer synthase from *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol.* 2008 May;190(9):3386-92.
147. Koster W. Cytoplasmic membrane iron permease systems in the bacterial cell envelope. *Front Biosci.* 2005 Jan 01;10:462-77.
148. Guerinot ML. Microbial iron transport. *Annu Rev Microbiol.* 1994;48:743-72.
149. Skaar EP. The battle for iron between bacterial pathogens and their vertebrate hosts. *PLoS Pathog.* 2010 Aug 12;6(8):e1000949.
150. Cherayil BJ. The role of iron in the immune response to bacterial infection. *Immunol Res.* 2011 May;50(1):1-9.
151. Nairz M, Schroll A, Sonnweber T, Weiss G. The struggle for iron - a metal at the host-pathogen interface. *Cell Microbiol.* 2010 Dec;12(12):1691-702.
152. Smith MG, Gianoulis TA, Pukatzki S, Mekalanos JJ, Ornston LN, Gerstein M, et al. New insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis. *Genes Dev.* 2007 Mar 01;21(5):601-14.
153. Krewulak KD, Vogel HJ. Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Sep;1778(9):1781-804.
154. Wandersman C, Delepelaire P. Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu Rev Microbiol.* 2004;58:611-47.
155. Miethke M, Marahiel MA. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2007 Sep;71(3):413-51.
156. Zimble DL, Penwell WF, Gaddy JA, Menke SM, Tomaras AP, Connerly PL, et al. Iron acquisition functions expressed by the human pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Biometals.* 2009 Feb;22(1):23-32.

157. Antunes LC, Imperi F, Towner KJ, Visca P. Genome-assisted identification of putative iron-utilization genes in *Acinetobacter baumannii* and their distribution among a genotypically diverse collection of clinical isolates. *Res Microbiol.* 2011 Apr;162(3):279-84.
158. Saha R, Saha N, Donofrio RS, Bestervelt LL. Microbial siderophores: a mini review. *J Basic Microbiol.* 2013 Apr;53(4):303-17.
159. Chakraborty R, Storey E, van der Helm D. Molecular mechanism of ferricsiderophore passage through the outer membrane receptor proteins of *Escherichia coli*. *Biometals.* 2007 Jun;20(3-4):263-74.
160. Dorsey CW, Tomaras AP, Connerly PL, Tolmasky ME, Crosa JH, Actis LA. The siderophore-mediated iron acquisition systems of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 and *Vibrio anguillarum* 775 are structurally and functionally related. *Microbiology.* 2004 Nov;150(Pt 11):3657-67.
161. Yamamoto S, Okujo N, Sakakibara Y. Isolation and structure elucidation of acinetobactin, a novel siderophore from *Acinetobacter baumannii*. *Arch Microbiol.* 1994;162(4):249-54.
162. Eijkelkamp BA, Hassan KA, Paulsen IT, Brown MH. Investigation of the human pathogen *Acinetobacter baumannii* under iron limiting conditions. *BMC Genomics.* 2011 Feb 23;12:126.
163. Gaddy JA, Arivett BA, McConnell MJ, Lopez-Rojas R, Pachon J, Actis LA. Role of acinetobactin-mediated iron acquisition functions in the interaction of *Acinetobacter baumannii* strain ATCC 19606T with human lung epithelial cells, *Galleria mellonella* caterpillars, and mice. *Infect Immun.* 2012 Mar;80(3):1015-24.
164. Penwell WF, Arivett BA, Actis LA. The *Acinetobacter baumannii* entA gene located outside the acinetobactin cluster is critical for siderophore production, iron acquisition and virulence. *PLoS One.* 2012;7(5):e36493.

# Bibliografía

---

165. Lau CK, Krewulak KD, Vogel HJ. Bacterial ferrous iron transport: the Feo system. *FEMS Microbiol Rev.* 2016 Mar;40(2):273-98.
166. Ge R, Sun X. Iron trafficking system in *Helicobacter pylori*. *Biometals.* 2012 Apr;25(2):247-58.
167. Hantke K. Ferrous iron transport mutants in *Escherichia coli* K12. *FEMS Microbiol Lett.* 1987;44:53-7.
168. Kammler M, Schon C, Hantke K. Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1993 Oct;175(19):6212-9.
169. Hantke K. Is the bacterial ferrous iron transporter FeoB a living fossil? *Trends Microbiol.* 2003 May;11(5):192-5.
170. Cartron ML, Maddocks S, Gillingham P, Craven CJ, Andrews SC. Feo-- transport of ferrous iron into bacteria. *Biometals.* 2006 Apr;19(2):143-57.
171. Lau CK, Ishida H, Liu Z, Vogel HJ. Solution structure of *Escherichia coli* FeoA and its potential role in bacterial ferrous iron transport. *J Bacteriol.* 2013 Jan;195(1):46-55.
172. Kim H, Lee H, Shin D. The FeoA protein is necessary for the FeoB transporter to import ferrous iron. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 Jul 13;423(4):733-8.
173. Hilgenfeld R. How do the GTPases really work? *Nat Struct Biol.* 1995 Jan;2(1):3-6.
174. Eng ET, Jalilian AR, Spasov KA, Unger VM. Characterization of a novel prokaryotic GDP dissociation inhibitor domain from the G protein coupled membrane protein FeoB. *J Mol Biol.* 2008 Jan 25;375(4):1086-97.

175. Hung KW, Chang YW, Eng ET, Chen JH, Chen YC, Sun YJ, et al. Structural fold, conservation and Fe(II) binding of the intracellular domain of prokaryote FeoB. *J Struct Biol.* 2010 Jun;170(3):501-12.
176. Maddocks SE, Oyston PC. Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology.* 2008 Dec;154(Pt 12):3609-23.
177. Stojiljkovic I, Cobeljic M, Hantke K. *Escherichia coli* K-12 ferrous iron uptake mutants are impaired in their ability to colonize the mouse intestine. *FEMS Microbiol Lett.* 1993 Mar 15;108(1):111-5.
178. Velayudhan J, Hughes NJ, McColm AA, Bagshaw J, Clayton CL, Andrews SC, et al. Iron acquisition and virulence in *Helicobacter pylori*: a major role for FeoB, a high-affinity ferrous iron transporter. *Mol Microbiol.* 2000 Jul;37(2):274-86.
179. Wyckoff EE, Mey AR, Leimbach A, Fisher CF, Payne SM. Characterization of ferric and ferrous iron transport systems in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol.* 2006 Sep;188(18):6515-23.
180. Weaver EA, Wyckoff EE, Mey AR, Morrison R, Payne SM. FeoA and FeoC are essential components of the *Vibrio cholerae* ferrous iron uptake system, and FeoC interacts with FeoB. *J Bacteriol.* 2013 Nov;195(21):4826-35.
181. Perry RD, Mier I, Jr., Fetherston JD. Roles of the Yfe and Feo transporters of *Yersinia pestis* in iron uptake and intracellular growth. *Biometals.* 2007 Jun;20(3-4):699-703.
182. Sabri M, Caza M, Proulx J, Lymberopoulos MH, Bree A, Moulin-Schouleur M, et al. Contribution of the SitABCD, MntH, and FeoB metal transporters to the virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain chi7122. *Infect Immun.* 2008 Feb;76(2):601-11.

# Bibliografía

---

183. Wyckoff EE, Boulette ML, Payne SM. Genetics and environmental regulation of *Shigella* iron transport systems. *Biometals*. 2009 Feb;22(1):43-51.
184. Subashchandrabose S, Smith S, DeOrnellas V, Crepin S, Kole M, Zahdeh C, et al. *Acinetobacter baumannii* Genes Required for Bacterial Survival during Bloodstream Infection. *mSphere*. 2016 Jan-Feb;1(1).
185. Corbella X, Montero A, Pujol M, Dominguez MA, Ayats J, Argerich MJ, et al. Emergence and rapid spread of carbapenem resistance during a large and sustained hospital outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol*. 2000 Nov;38(11):4086-95.
186. Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Oct;51(10):3471-84.
187. Rumbo C, Gato E, Lopez M, Ruiz de Alegria C, Fernandez-Cuenca F, Martinez-Martinez L, et al. Contribution of efflux pumps, porins, and beta-lactamases to multidrug resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Nov;57(11):5247-57.
188. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet*. 2010 Jan;11(1):31-46.
189. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*. 2005 Sep 15;437(7057):376-80.
190. Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, Smith GP, Milton J, Brown CG, et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*. 2008 Nov 6;456(7218):53-9.

191. Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, Davey M, et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*. 2011 Jul 20;475(7356):348-52.
192. Eid J, Fehr A, Gray J, Luong K, Lyle J, Otto G, et al. Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science*. 2009 Jan 2;323(5910):133-8.
193. Loman NJ, Misra RV, Dallman TJ, Constantinidou C, Gharbia SE, Wain J, et al. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nat Biotechnol*. 2012 May;30(5):434-9.
194. Nagarajan N, Pop M. Sequence assembly demystified. *Nat Rev Genet*. 2013 Mar;14(3):157-67.
195. Treangen TJ, Salzberg SL. Repetitive DNA and next-generation sequencing: computational challenges and solutions. *Nat Rev Genet*. 2011 Nov 29;13(1):36-46.
196. Jeon J, Kim JW, Yong D, Lee K, Chong Y. Complete genome sequence of the podoviral bacteriophage YMC/09/02/B1251 ABA BP, which causes the lysis of an OXA-23-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolate from a septic patient. *J Virol*. 2012 Nov;86(22):12437-8.
197. Chen LK, Liu YL, Hu A, Chang KC, Lin NT, Lai MJ, et al. Potential of bacteriophage PhiAB2 as an environmental biocontrol agent for the control of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *BMC Microbiol*. 2013 Jul 8;13:154.
198. Merabishvili M, Vandenheuvel D, Kropinski AM, Mast J, De Vos D, Verbeken G, et al. Characterization of newly isolated lytic bacteriophages active against *Acinetobacter baumannii*. *PLoS One*. 2014;9(8):e104853.
199. Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG, Jr. Bacteriophage therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Mar;45(3):649-59.

## Bibliografía

---

200. Zarrilli R, Pournaras S, Giannouli M, Tsakris A. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. *Int J Antimicrob Agents*. 2013 Jan;41(1):11-9.
201. Diancourt L, Passet V, Nemec A, Dijkshoorn L, Brisse S. The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PLoS One*. 2010 Apr 7;5(4):e10034.
202. Giannouli M, Antunes LC, Marchetti V, Triassi M, Visca P, Zarrilli R. Virulence-related traits of epidemic *Acinetobacter baumannii* strains belonging to the international clonal lineages I-III and to the emerging genotypes ST25 and ST78. *BMC Infect Dis*. 2013 Jun 20;13:282.
203. Lee HW, Koh YM, Kim J, Lee JC, Lee YC, Seol SY, et al. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. *Clin Microbiol Infect*. 2008 Jan;14(1):49-54.
204. de Breij A, Dijkshoorn L, Lagendijk E, van der Meer J, Koster A, Bloemberg G, et al. Do biofilm formation and interactions with human cells explain the clinical success of *Acinetobacter baumannii*? *PLoS One*. 2010 May 20;5(5):e10732.
205. Espinal P, Marti S, Vila J. Effect of biofilm formation on the survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *J Hosp Infect*. 2012 Jan;80(1):56-60.
206. Chahales P, Thanassi DG. Structure, Function, and Assembly of Adhesive Organelles by Uropathogenic Bacteria. *Microbiol Spectr*. 2015 Oct;3(5).
207. Puorger C, Vetsch M, Wider G, Glockshuber R. Structure, folding and stability of FimA, the main structural subunit of type 1 pili from uropathogenic *Escherichia coli* strains. *J Mol Biol*. 2011 Sep 23;412(3):520-35.
208. Lasa I, Penades JR. Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. *Res Microbiol*. 2006 Mar;157(2):99-107.



209. Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, Penades JR. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol.* 2001 May;183(9):2888-96.
210. Dorsey CW, Tolmasky ME, Crosa JH, Actis LA. Genetic organization of an *Acinetobacter baumannii* chromosomal region harbouring genes related to siderophore biosynthesis and transport. *Microbiology.* 2003 May;149(Pt 5):1227-38.
211. Mihara K, Tanabe T, Yamakawa Y, Funahashi T, Nakao H, Narimatsu S, et al. Identification and transcriptional organization of a gene cluster involved in biosynthesis and transport of acinetobactin, a siderophore produced by *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606T. *Microbiology.* 2004 Aug;150(Pt 8):2587-97.
212. Proschak A, Lubuta P, Grun P, Lohr F, Wilharm G, De Berardinis V, et al. Structure and biosynthesis of fimsbactins A-F, siderophores from *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter baylyi*. *Chembiochem.* 2013 Mar 18;14(5):633-8.
213. Penwell WF, DeGrace N, Tentarelli S, Gauthier L, Gilbert CM, Arivett BA, et al. Discovery and Characterization of New Hydroxamate Siderophores, Baumannoferrin A and B, produced by *Acinetobacter baumannii*. *Chembiochem.* 2015 Jul 27.
214. Harding RA, Royt PW. Acquisition of iron from citrate by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol.* 1990 Sep;136(9):1859-67.
215. Ratledge C, Dover LG. Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2000;54:881-941.
216. Naikare H, Palyada K, Panciera R, Marlow D, Stintzi A. Major role for FeoB in *Campylobacter jejuni* ferrous iron acquisition, gut colonization, and intracellular survival. *Infect Immun.* 2006 Oct;74(10):5433-44.
217. Aranda J, Cortes P, Garrido ME, Fittipaldi N, Llagostera M, Gottschalk M, et al. Contribution of the FeoB transporter to *Streptococcus suis* virulence. *Int Microbiol.* 2009 Jun;12(2):137-43.

## Bibliografía

---

218. Zimble DL, Arivett BA, Beckett AC, Menke SM, Actis LA. Functional features of TonB energy transduction systems of *Acinetobacter baumannii*. *Infect Immun*. 2013 Sep;81(9):3382-94.

219. Miller AF. Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights. *FEBS Lett*. 2012 Mar 9;586(5):585-95.

# ***CURRICULUM VITAE***



## **VII. CURRICULUM VITAE**

### **LAURA ÁLVAREZ FRAGA**

#### **INFORMACIÓN PERSONAL**

Nombre: Laura Álvarez  
Fraga  
Nacionalidad: Española  
Año de nacimiento: 1987

#### **INFORMACIÓN DE CONTACTO**

Teléfono: +34 667457825  
Email: laualfra@hotmail.com  
Dirección: Avenida Xoán Carlos I 16  
1ºB 15670 Culleredo  
(España)

### **Formación académica**

---

#### **Máster Universitario en Microbiología Avanzada**

Oct 2010 – Sept 2011      Universitat de Barcelona. Barcelona. Facultad de Biología.

Orientación Microbiología Sanitaria

Oct 2005 – Julio 2010

#### **Licenciatura en Biología**

Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela. Facultad de Biología

Especialidad Biología Molecular y Biotecnología

### **Experiencia profesional**

---

#### **Investigadora predoctoral**

Nov 2012 – Ene 2018      C.H.U. A Coruña. A Coruña (España). Servicio de Microbiología – Instituto de Investigación Biomédica A Coruña (INIBIC)

## Curriculum vitae

---

Desarrollo de la tesis doctoral titulada: Caracterización de nuevos factores de virulencia del patógeno nosocomial *Acinetobacter baumannii*.

### **Estudiante en prácticas**

Verano 2011

Centro Analítico Míguez Muiños, S.L. Vigo (España). Laboratorio de Microbiología

- Preparación de medios de cultivo
- Preparación de muestras para su análisis microbiológico
- Participación activa en la realización de análisis microbiológicos de alimentos y aguas de uso público.
- Participación activa en la realización de análisis de manipuladores y controles ambientales.

### **Estudiante en prácticas de máster universitario**

Oct 2010 – Sept 2011

Universitat de Barcelona. Barcelona (España). Departamento de Microbiología. Laboratorio de Virus Entéricos

Desarrollo del proyecto final de máster titulado: “Optimización de la RT-PCR a tiempo real en formato cuádruplex para la detección del virus de la Hepatitis A (HAV), Mengovirus, Norovirus genogrupo I y Norovirus genogrupo II” bajo la tutela de la Dra. Rosa María Pintó y el Dr. Albert Bosch Navarro.

### **Estudiante en prácticas**

Verano 2010

Asociación Nacional de Fabricantes de Conservas de Pescado y Mariscos (ANFACO). Vigo (España). Área de Microbiología y Toxinas

- Realización de análisis microbiológicos cuantitativos, cualitativos y del número más probable (NMP) y detección de distintos patógenos.

- Participación en los análisis de biotoxinas marinas (PSP, DSP y ASP).

## Cursos

---

Marzo 2014

### GS Software Winter School

Roche Diagnostics Deutschland GmbH. EMEA-LATAM RAS Customer Support Center. Mannheim (Alemania).

Noviembre 2013

### Curso Práctico de Iniciación al uso de la Supercomputación aplicado a la Metagenómica y Genómica comparada

Universidad de León. León (España). Edificio CRAI-TIC, Campus Vegazana

## Participación en proyectos de investigación

---

**PI17/01482.** Evaluación de nuevas estrategias antimicrobianas mediante silenciamiento de ARN vehiculado en nanocápsulas e inhibidores enzimáticos. Instituto de Salud Carlos III. 01/01/2018 - 31/12/2020. IPs: Alejandro Beceiro y Margarita Poza Domínguez

**01216A.** Estudio de los mecanismos implicados en la colonización y epidemicidad del patógeno nosocomial *K. pneumoniae*: búsqueda de nuevas estrategias para erradicar una infección. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 01/09/2016 - 31/08/2018. IP: Astrid Pérez Gómez

**P14/00059.** Nuevas estrategias frente al patógeno multirresistente *Acinetobacter baumannii*: silenciamiento (siRNA) bacteriano y desarrollo de nuevos inhibidores. Evaluación en estudios preclínicos. Instituto de Salud Carlos III. 01/01/2015 – 31/12/2017. IPs: Alejandro Beceiro Casas y Margarita Poza Domínguez

## Publicaciones

---

- 2018** **Álvarez-Fraga L**, Vázquez-Ucha JC, Martínez-Gutián M, Vallejo JA, Bou G, Beceiro A, Poza M. (2018) Pneumonia infection in mice reveals the involvement of the *feoA* gene in the pathogenesis of *Acinetobacter baumannii*. *Virulence*, DOI: 10.1080/21505594.2017.1420451
- 2017** Perez, M. Merino, S. Rumbo-Feal, **L. Álvarez-Fraga**, J. A. Vallejo, A. Beceiro, E. J. Ohneck, J. Mateos, P. Fernandez-Puente, L. A. Actis, M. Poza and G. Bou (2017) The FhaB/FhaC two-partner secretion system is involved in adhesion of *Acinetobacter baumannii* AbH12O-A2 strain, *Virulence*, 8(6): 959–974, DOI: 10.1080/21505594.2016.1262313
- Rumbo-Feal S, Pérez A, Ramelot TA, **Álvarez-Fraga L**, Vallejo JA, Beceiro A, Ohneck EJ, Arivett BA, Merino M, Fiester SE, Kennedy MA, Actis LA, Bou G and Poza M (2017) Contribution of the *A. baumannii* A1S\_0114 Gene to the Interaction with Eukaryotic Cells and Virulence. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7:108. doi: 10.3389/fcimb.2017.00108
- Álvarez-Fraga L**, Rumbo-Feal S, Pérez A, Gómez MJ, Gayoso C, Vallejo JA, Ohneck EJ, Valle J, Actis LA, Beceiro A, Bou G and Poza M (2017) Global assessment of small RNAs reveals a non-coding transcript involved in biofilm formation and attachment in *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978. *PLoS ONE* 12(8):e0182084. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182084>
- 2016** **Laura Álvarez-Fraga**, Astrid Pérez, Soraya Rumbo-Feal, María Merino, Juan Andrés Vallejo, Emily J. Ohneck, Richard E. Edelmann, Alejandro Beceiro, Juan C. Vázquez-Ucha, Jaione Valle, Luis A. Actis, Germán Bou & Margarita Poza (2016) Analysis of the role of the LH92\_11085 gene of a biofilm hyper-producing *Acinetobacter baumannii* strain on biofilm formation and attachment to eukaryotic cells, *Virulence*, 7:4, 443-455, DOI: 10.1080/21505594.2016.1145335.



- López M, **Álvarez-Fraga L**, Gato E, Blasco L, Poza M, Fernández-García L, Bou G, Tomás M. 2016. Genome sequence of a clinical strain of *Acinetobacter baumannii* belonging to the ST79/PFGE-HUI-1 clone lacking the AdeABC (resistance-nodulation-cell division-type) efflux pump. *Genome Announc* 4(5):e00962-16. doi:10.1128/genomeA.00962-16.
- 2015** **Álvarez-Fraga L**, López M, Merino M, Rumbo-Feal S, Tomás M, Bou G, Poza M. 2015. Draft genome sequence of the biofilm-hyperproducing *Acinetobacter baumannii* clinical strain MAR002. *Genome Announc* 3(4):e00824-15. doi:10.1128/genomeA.00824-15.
- 2014** Merino M, **Álvarez-Fraga L**, Gómez MJ, Aransay AM, Lavín JL, Chaves F, Bou G, Poza M. 2014. Complete genome sequence of the multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain AbH12O-A2, isolated during a large outbreak in Spain. *Genome Announc*. 2(6):e01182-14. doi:10.1128/genomeA.01182-14.
- 2013** Rumbo-Feal S, Gómez MJ, Gayoso C, **Álvarez-Fraga L**, Cabral MP, et al. (2013) Whole Transcriptome Analysis of *Acinetobacter baumannii* Assessed by RNA-Sequencing Reveals Different mRNA Expression Profiles in Biofilm Compared to Planktonic Cells. *PLoS ONE* 8(8): e72968. doi:10.1371/journal.pone.0072968.

### Comunicaciones y pósteres a congresos

- 2017** **Álvarez-Fraga, L**; Vázquez-Ucha, JC; Martínez-Gutián, M; Vallejo, JA; Rumbo-Feal, S; Bou, G; Beceiro, A; Poza, M. The *feoA* gene from *A. baumannii* 17978 is involved in the course of pneumonia infection. 11th International Symposium of the Biology of *Acinetobacter*. Sevilla (España). 20/09/2017 – 22/09/2017.
- Martínez-Gutián, M; Vázquez-Ucha, JC; **Álvarez-Fraga, L**; Rumbo-Feal, S; Vallejo, JA; Bou, G; Poza, M; Beceiro, A. New genes of *Acinetobacter baumannii* required

for virulence in mouse model of pneumonia. 11th International Symposium of the Biology of Acinetobacter. Sevilla (España). 20/09/2017 – 22/09/2017.

Martínez-Gutián, M; Vázquez-Ucha, JC; **Álvarez-Fraga, L**; Rumbo-Feal, S; Vallejo, JA; Bou, G; Poza, M; Beceiro, A. Implication of the *Acinetobacter baumannii* A1S\_3245 gene (*hisF*) in lung persistence and pneumonia infection. . Jornadas BiolIntegraSaúde 2017. A Coruña (España). 30/05/2017

**Álvarez-Fraga L**; Vázquez-Ucha JC; Martínez-Gutián M; Vallejo JA; Bou G; Beceiro A; Poza M. In vivo transcriptomic analysis of *Acinetobacter baumannii* 17978 reveals that the A1S\_0242 gene is involved in the course of pneumonia infection. Jornadas BiolIntegraSaúde 2017. A Coruña (España). 30/05/2017.

E. Gato, **L. Álvarez-Fraga**, JA. Vallejo, S. Rumbo-Feal, M. Martínez-Gutián, A. Beceiro, J. Ramos-Vivas, M. Lázaro, M. Pérez-Vázquez, J. Oteo, M. Poza, G. Bou, A. Pérez. Caracterización de un nuevo sistema *chaperone-usher-fimbriae* en *Klebsiella pneumoniae* implicado en adherencia a células eucariotas. XXI Congreso Nacional SEIMC. Málaga (España). 11/05/2017 – 13/05/2017.

**Laura Álvarez-Fraga**, Juan C. Vázquez-Ucha, Marta Martínez-Guitian, Juan Andrés Vallejo, Germán Bou, Alejandro Beceiro and Margarita Poza. *In vivo* transcriptomic analysis of *A. baumannii* 17978 reveals that the A1S\_0242 gene is involved in the course of pneumonia infection. 27th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Viena (Austria). 22/04/2017 – 25/04/2017.

E. Gato, **L. Álvarez-Fraga**, Juan. A. Vallejo, S. Rumbo-Feal, M. Martínez-Gutián, A. Beceiro, J. Ramos-Vivas, M. Lázaro, M. Pérez-Vázquez, J. Oteo, M. Poza, G. Bou, A. Pérez. Whole genome analysis of a OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* causing an outbreak revealed an novel *chaperone-usher fimbriae* system involved in adherence to eukaryotic cells. 27th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Viena (Austria). 22/04/2017 – 25/04/2017.

Martínez-Gutián, M; Vázquez-Ucha, JC; **Álvarez-Fraga, L**; Vallejo, JA; Bou, G; Poza, M; Beceiro, A. Implication of the *Acinetobacter baumannii* A1S\_3245 gene (*hisF*) in lung persistence and pneumonia infection. 27th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Viena (Austria). 22/04/2017 – 25/04/2017.

**2016** López, M; Blasco, L; **Álvarez Fraga, L**; Poza, M; Martínez-Martínez, L; Fernández-Cuenca, F; Vila, J; Cisneros, JM; Pachón, J; Rodríguez-Baño, J; Pascual, A; Bou, G; Tomás, M. Efecto de las sales biliares (SB) en cepas clínicas de *Acinetobacter baumannii*: incremento de virulencia asociada al quorum sensing (QS) y co-resistencia con antimicrobianos. XX Congreso Nacional SEIMC. Barcelona (España). 26/05/2016 – 28/05/2016

Rumbo-Feal, S; Pérez, A; Arivett, BA; Ramelot, TA; Beceiro, A; Vallejo, JA; **Álvarez-Fraga, L**; Merino, M; Ohneck, EJ ;Kennedy, MA; Actis, LA; Bou, G; Poza, M. Role of the *Acinetobacter baumannii* A1S\_0114 gene in biofilm formation, attachment, motility and virulence. 26th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Amsterdam (Holanda). 09/04/2016 – 12/04/2016.

**Álvarez-Fraga, L**; Pérez, A; Rumbo-Feal, S; Merino, M; Vallejo, JA; Ohneck, EJ; Edelmann, RE; Beceiro, A; Vázquez-Ucha, JC; Actis, LA; Bou, G; Poza, M. The LH92\_11085 gene plays a role in the virulence of the *Acinetobacter baumannii* MAR002 strain. 26th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Amsterdam (Holanda). 09/04/2016 – 12/04/2016.

**2015** Rumbo-Feal S, **Alvarez-Fraga L**, Vallejo JA, Martínez M, Bou G, Beceiro A, Poza M. Transcriptomic analysis of *A. baumannii* during the course of pneumonia infection. 10th International Symposium on the Biology of Acinetobacter. Atenas (Grecia). 03/05/2015 – 05/05/2015.

**Álvarez-Fraga, L**; Rumbo-Feal, S; Merino, M; Vallejo, JA; López, M; Pérez, A ; Ohneck, EJ; Actis, LA; Bou, G; Poza, M. Whole genome analysis of a biofilm

## Curriculum vitae

---

hyper-producing clinical strain of *Acinetobacter baumannii* revealed a spore coat protein involved in biofilm formation and attachment. 25th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID); Copenhagen (Dinamarca). 25/04/2015 – 28/04/2015.

Merino, M; **Álvarez-Fraga, L**; Rumbo-Feal, S; Vallejo, JA; Pérez, A; Ohneck, EJ ; Actis, LA; Poza, M, Bou, G. Whole genome analysis of the *Acinetobacter baumannii* strain AbH12O-A2 causing a large outbreak revealed a FhaB/FhaC-like two partner secretion system involved in adhesión. 25th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID); Copenhagen (Dinamarca). 25/04/2015 – 28/04/2015.

**2012** Rumbo-Feal, S; Gómez, M J; Gayoso, C; **Álvarez-Fraga, L**; Bou, G; Poza, M. La descripción global de pequeñas moléculas de RNA en *Acinetobacter baumannii* revela RNAs no codificantes involucrados en la formación de biofilms. IV Congreso del Grupo Especializado Biología de Microorganismos Patógenos; Badajoz (España). 05/07/2012 - 07/07/2012.

## Idiomas

---

<b>Español</b>	Nativo	<b>Gallego</b>	Celga 4
<b>Inglés</b>	B2	<b>Catalán</b>	A2