

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

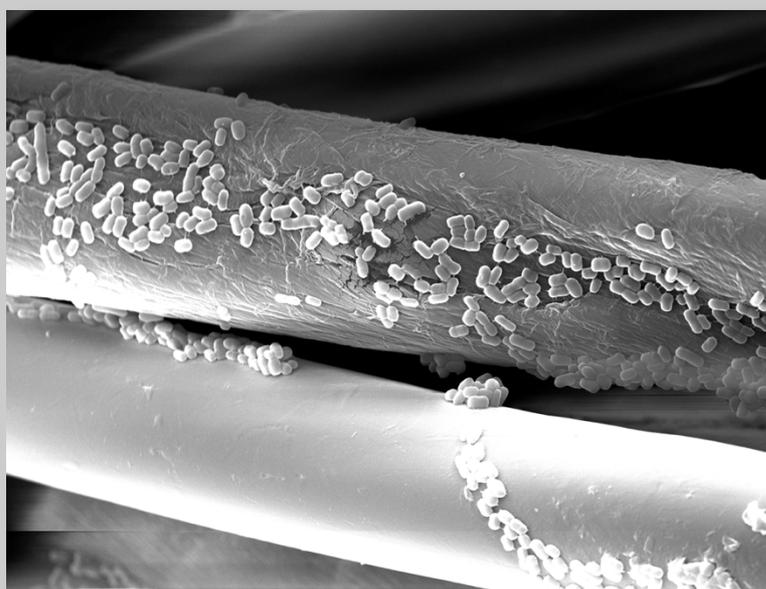


ESCUELA DE DOCTORADO DE LA UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

DOCTORADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOMEDICINA

TESIS DOCTORAL

**BIOLOGÍA INTEGRADA DE LA INFECCIÓN
Y RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DE
Acinetobacter baumannii Y *Acinetobacter pittii***



Presentada por: **ITZIAR CHAPARTEGUI GONZÁLEZ**

Dirigida por: **Dr. JOSÉ RAMOS VIVAS**

Santander, abril de 2019

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA



ESCUELA DE DOCTORADO DE LA UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

DOCTORADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOMEDICINA

TESIS DOCTORAL

BIOLOGÍA INTEGRADA DE LA INFECCIÓN
Y RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DE
Acinetobacter baumannii Y *Acinetobacter pittii*

Presentada por: **ITZIAR CHAPARTEGUI GONZÁLEZ**

Dirigida por: **Dr. JOSÉ RAMOS VIVAS**

Santander, abril de 2019

José Ramos Vivas, Investigador del grupo de Epidemiología y Mecanismos Patogénicos y Moleculares de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica del Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla (IDIVAL).

CERTIFICA: que Itziar Chapartegui González, Egresada en Biología, ha desarrollado bajo mi dirección la Tesis Doctoral titulada “**Biología Integrada de la Infección y Resistencia Antimicrobiana de *Acinetobacter baumannii* y *Acinetobacter pittii***”.

Considero que el trabajo es original y cumple los requisitos necesarios para optar al grado de Doctor por la Universidad de Cantabria.

De acuerdo con la normativa vigente, firmo el presente certificado, autorizando su presentación como director de la mencionada Tesis Doctoral.

Santander, abril de 2019

Fdo.: Dr. José Ramos Vivas

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a la financiación recibida de los siguientes proyectos de investigación:

- **Interacciones clave hospedador patógeno en especies de *Acinetobacter* de relevancia clínica.** 2013-2016. Instituto de Salud Carlos III. FIS, PI13/01310. I.P: Dr. José Ramos Vivas.
- **Biología integrada de la infección y la resistencia antimicrobiana de *Acinetobacter baumannii* y *A. pittii*.** 2016-2019. Instituto de Salud Carlos III. FIS, PI16/01103. I.P: Dr. José Ramos Vivas.

A mis padres

A Miguel

*“Siento una enorme gratitud por todos los que me
dijeron ‘no’. Gracias a ellos lo hice yo mismo”*

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

Llevar a cabo una Tesis Doctoral no siempre es un camino de rosas. Ya de por sí es un periodo estresante que te puede poner a prueba a muchos niveles y de muchas maneras distintas. Sin embargo, hay ocasiones en las que, por motivos ajenos a una misma, se encuentran más baches con los que tropezar. Me siento orgullosa y honrada de poder decir que hay mucha gente a la que tengo algo que agradecer, gente sin la cual, es probable que no hubiera llegado hasta este momento, no solo a nivel profesional, sino también a nivel personal.

En primer lugar, quiero y debo agradecer a las personas cuyas vidas me inspiraron a seguir el camino que me ha traído hasta aquí, a mis abuelos Encarna y Avelino, quienes nos abandonaron demasiado pronto. Mirarme a través de sus ojos me impulsa cada día a dar lo mejor de mí.

En segundo lugar, agradezco a las personas que han confiado en mí en todo momento y a lo largo de toda mi vida, y que han compartido todo cuanto tenían conmigo para que pudiera seguir avanzando, a mis padres, Mar y Patxi.

También debo agradecer a la persona que ha sido mi apoyo y mi roca, quien me ha visto cada día esforzarme y cuya ayuda, sacrificio y compañía me ha permitido llegar a dónde estoy, a mi pareja, Miguel. El camino hubiera sido mucho más arduo sin ti.

No podría olvidar a mi compañera, a María, que ha sido el oído, el hombro y la mano que necesité en todo momento, dentro y fuera del laboratorio. Tener alguien como ella que me comprendía y que compartía mis *peculiaridades* ha sido más beneficioso de lo que nunca podré asumir.

Imposible no agradecer a mi director, Jose, por darme lo que nadie antes me había dado, una oportunidad. Por ello, y por todo el esfuerzo que ha dedicado en mi formación siempre estaré agradecida.

Continuando con los agradecimientos profesionales, no puedo olvidar a Santi, tanto por sus enseñanzas como por su paciencia conmigo; a Zalóa, que me enseñó la paciencia y el sacrificio necesarios para los momentos más complicados; a Carlota, quien compartía conmigo la idea indomable. Del mismo modo que debo agradecer al Profesor Valvano y a todo su equipo la magnífica acogida que me ofrecieron entre ellos, y todo lo que a su lado aprendí, en especial a la Dra. Shi-Qi An y mi por dos meses compañera Sarina. También

debo agradecer al Dr. Fidel Madrazo por su ayuda con la microscopía confocal, al Dr. Jose M. Icardo por su ayuda con la microscopía electrónica; y al equipo del Dr. Alain Ocampo por su ayuda en los ensayos de PFGGE, especialmente a Laura por su tiempo.

A todas las “chicas”, ellas saben quiénes son: mis peluqueras, mis guías de viajes, mis callejeros de Santander, mis sonrisas, mis apoyos, mis frikis, mis protectoras... en resumen, mis amigas. Ellas me aceptaron como a una más desde el primer día, sabiendo lo difícil que eso puede resultar, consiguiendo que hallara mi sitio y me sintiera comprendida. Gracias a ellas he aprendido mucho y he conseguido objetivos que se me antojaban inalcanzables.

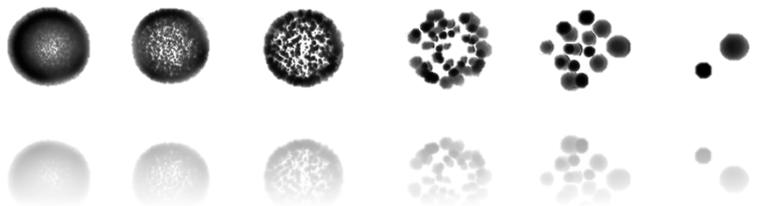
Puede que me extienda más de lo necesario, pero a nivel personal, hay muchas personas a las que quiero nombrar. Dentro de mi familia, más allá de todo el apoyo y la compañía que me han brindado en conjunto, quiero agradecer a mi prima Naia, el cajón desastre de mis quejas, la facilidad y calma que siempre ha tenido para escucharme, aunque fuera silencio todo lo que necesitara decir; y a mi tía Eusebi por saber ser en cada momento la persona y el familiar que necesitaba, ese incondicional apoyo que todos a veces deseamos. Dentro de mis amigos: a mi Silvia, que aunque lejos siempre estuvo al otro lado del teléfono para proporcionarme la confianza en mí misma que me podía faltar; a mi no hermano Iván por poner siempre el punto de locura hasta en los momentos más oscuros; y a mis chicos Mario y Marco, por estar en y para toda ocasión, buena o mala, aunque acabara por los suelos. Por último, dentro de mi familia escogida, a mi rubia Isa, por ser la cordura en mi locura; y a sus dos peques Jimena y Carlota que me han dado más cariño del que podía imaginar.

Conforme iba escribiendo estos agradecimientos me surgían momentos a la memoria, y por duro que haya sido el camino hasta aquí, gracias a toda esta gente solo me quedo con lo bueno. Quizá la lista pueda parecer larga, pero eso no me hace sino sentir aún más orgullosa de haberme rodeado de gente tan maravillosa y de haber contado con tanto apoyo como lo he hecho. Para mí, en cambio, no es una lista, sino todos los elementos que han formado parte de mi Tesis Doctoral, y de mi desarrollo personal.

Solamente hay una cosa que me queda por decir, con siete letras y la promesa de nunca olvidar lo que habéis hecho por mí,

Gracias.

ÍNDICE



| | |
|-------------------------------------------------|------|
| ÍNDICE | i |
| ÍNDICE DE TABLAS | viii |
| ÍNDICE DE FIGURAS | ix |
| ABREVIATURAS | xi |
| RESUMEN/SUMMARY | xvii |
| RESUMEN | xix |
| SUMMARY | xxi |
| | |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| | |
| 1. Género <i>Acinetobacter</i> | 3 |
| a. Especies | 4 |
| - Taxones principales | 9 |
| - Ecología y hábitat | 10 |
| | |
| 2. <i>Acinetobacter baumannii</i> | 13 |
| a. Genética de <i>A. baumannii</i> | 14 |
| i. Genomas | 14 |
| ii. Elementos genéticos móviles (EGM) | 16 |
| iii. Plásmidos | 20 |
| - Ciclo plasmídico | 23 |
| - Conjugación bacteriana | 25 |
| - Clasificación plasmídica | 26 |
| b. Patogénesis | 26 |
| i. Factores de virulencia | 27 |
| - OmpA | 28 |
| - Lipopolisacárido (LPS) | 30 |
| - Polisacárido capsular (CPS) | 31 |
| - <i>Outer Membrane Vesicles</i> (OMVs) | 31 |
| - Fosfolipasas | 32 |
| - PBP's (Penicillin Binding Proteins) | 33 |
| - Sideróforos | 34 |
| - Biofilm | 35 |
| - Sistema de secreción de tipo VI | 37 |
| ii. Impacto clínico de <i>A. baumannii</i> | 38 |
| - Neumonía adquirida en el hospital | 39 |
| - Neumonía adquirida en la comunidad | 40 |
| - Infecciones del torrente sanguíneo | 40 |
| - Traumas y heridas | 41 |
| - Meningitis | 41 |
| - Infecciones del tracto urinario | 41 |
| - Osteomielitis | 42 |
| - Endocarditis | 42 |
| - Peritonitis | 42 |
| c. Mecanismos de resistencia a los antibióticos | 42 |
| i. Mecanismos enzimáticos | 45 |

| | | |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| ii. | Mecanismos no enzimáticos _____ | 49 |
| - | Modificación de dianas _____ | 49 |
| - | Resistencia a otros antimicrobianos _____ | 51 |
| - | Bombas de expulsión _____ | 52 |
| - | Modificación proteínas de membrana externa _____ | 56 |
| d. | Persistencia de <i>A. baumannii</i> en el ambiente hospitalario _____ | 57 |
| i. | Factores que permiten su persistencia ambiental _____ | 57 |
| - | Resistencia a la desecación _____ | 58 |
| - | Resistencia a los desinfectantes y alcohol _____ | 61 |
| ii. | Transmisión de <i>A. baumannii</i> en el ambiente hospitalario _____ | 63 |
| e. | Factores genéticos que permiten su rol como patógeno nosocomial _____ | 65 |
| 3. | <i>Acinetobacter pittii</i> _____ | 67 |
| a. | Epidemiología y patogénesis _____ | 68 |
| b. | Mecanismos de resistencia _____ | 69 |
| 4. | Secuenciación, ensamblaje y anotación de genomas bacterianos _____ | 71 |
| a. | Tecnologías para la secuenciación de genomas _____ | 72 |
| - | Secuenciación NGS Illumina _____ | 73 |
| - | Secuenciación SMRT PacBio _____ | 73 |
| b. | Herramientas bioinformáticas _____ | 73 |
| i. | Python _____ | 73 |
| ii. | Ensamblaje de secuencias procedentes de WGS _____ | 74 |
| iii. | Anotación de genomas bacterianos _____ | 75 |
| - | RAST _____ | 75 |
| - | Prokka _____ | 76 |
| - | CARD _____ | 76 |
| - | ISfinder _____ | 76 |
| iv. | Comparativa de genomas bacterianos _____ | 77 |
| v. | Identificación de plásmidos _____ | 79 |
| | JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS _____ | 81 |
| | MATERIALES Y MÉTODOS _____ | 85 |
| 1. | Especies bacterianas y condiciones de cultivo _____ | 87 |
| a. | Cepas bacterianas _____ | 87 |
| b. | Medios y condiciones de cultivo _____ | 88 |
| c. | Curvas de crecimiento _____ | 89 |
| 2. | Determinación de concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) _____ | 90 |
| 3. | Estudio de supervivencia _____ | 91 |
| a. | Preparación de inóculos _____ | 91 |
| b. | Supervivencia en desecación _____ | 91 |
| - | Preparación de placas _____ | 92 |
| - | Toma de muestras _____ | 93 |
| - | Curvas de supervivencia _____ | 93 |
| - | Mínimo inóculo recuperable _____ | 94 |
| c. | Supervivencia en humedad _____ | 94 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------|------------|
| - Toma de muestras y curvas de supervivencia | 94 |
| d. Capacidad de formación de <i>biofilms</i> o biocapas | 94 |
| - Capacidad de recuperación | 95 |
| - Tinción con cristal violeta (CV) | 95 |
| - Normalización de biofilm | 96 |
| e. Microscopía confocal | 96 |
| f. Modelo animal de virulencia: <i>Galleria mellonella</i> | 97 |
| g. Resistencia al suero humano | 98 |
| h. Microscopía electrónica de barrido (SEM) | 98 |
| i. Análisis estadístico | 99 |
| 4. Identificación de plásmidos | 100 |
| a. PFGE | 100 |
| b. PCR | 103 |
| 5. Análisis genómico | 105 |
| a. Extracción del ADN | 105 |
| b. Secuenciación | 105 |
| - PacBio single-molecule real-time (SMRT) | 105 |
| - Illumina | 106 |
| c. Análisis bioinformático | 106 |
| - Python: anaconda 4.40 | 106 |
| - Ensamblaje: Unicycler | 106 |
| - Anotación | 107 |
| - Comparación | 109 |
| - PLACNET | 112 |
| 6. Estabilidad de plásmidos | 113 |
| a. Tiempo de generación | 113 |
| b. PCR | 113 |
| - Primers | 113 |
| - Condiciones | 114 |
| RESULTADOS | 117 |
| 1. Curvas de crecimiento | 119 |
| 2. Determinación de concentraciones mínimas inhibitorias | 121 |
| - <i>Acinetobacter baumannii</i> | 122 |
| - <i>Acinetobacter pittii</i> | 123 |
| 3. Estudio de supervivencia | 125 |
| a. Supervivencia en desecación y privación de nutrientes | 125 |
| i. Efecto de la temperatura | 125 |
| ii. Efecto del medio de cultivo | 129 |
| - <i>Acinetobacter baumannii</i> | 129 |
| - <i>Acinetobacter pittii</i> | 134 |
| c. Microscopía confocal | 138 |
| - <i>Acinetobacter baumannii</i> | 138 |
| - <i>Acinetobacter pittii</i> | 138 |

| | | |
|-----------|--------------------------------------------------------------|------------|
| d. | Adherencia a superficies abióticas | 141 |
| i. | Capacidad de formación de biofilm | 141 |
| - | <i>Acinetobacter baumannii</i> | 141 |
| - | <i>Acinetobacter pittii</i> | 144 |
| ii. | Velocidad de recuperación | 146 |
| - | <i>Acinetobacter baumannii</i> | 146 |
| - | <i>Acinetobacter pittii</i> | 146 |
| e. | Modelo animal de virulencia | 149 |
| f. | Resistencia a suero humano | 150 |
| g. | Microscopía electrónica de barrido | 152 |
| 4. | Identificación de plásmidos | 153 |
| a. | PFGE | 153 |
| b. | PCR | 154 |
| c. | Secuenciación PacBio | 154 |
| d. | PLACNET | 155 |
| 5. | Análisis genómico | 158 |
| a. | Comparativa de genomas | 158 |
| i. | Pan-genoma | 158 |
| ii. | Relación taxonómica | 160 |
| - | Árboles filogenéticos | 160 |
| - | ANI y DDH | 162 |
| iii. | Visualización de genomas | 163 |
| b. | Anotación de genomas y subsistemas | 165 |
| c. | Determinantes de resistencia | 168 |
| i. | Identificación de genes | 168 |
| ii. | Identificación secuencias de inserción | 170 |
| iii. | Mapeo de mutaciones | 170 |
| 6. | Estabilidad de plásmidos | 172 |
| a. | Tiempo de generación | 172 |
| b. | Estabilidad en generaciones | 172 |
| | DISCUSIÓN | 175 |
| 1. | Curvas de crecimiento | 177 |
| 2. | Determinación de concentraciones mínimas inhibitorias | 178 |
| 3. | Estudio de supervivencia | 179 |
| a. | Supervivencia en desecación y privación de nutrientes | 179 |
| b. | Valoración estado VBNC | 182 |
| c. | Adherencia a superficies abióticas | 184 |
| d. | Modelo animal de virulencia | 186 |
| e. | Resistencia a suero humano | 187 |
| 4. | Análisis genómico | 189 |
| a. | Comparativa de genomas | 189 |
| b. | Anotación de genomas y subsistemas | 192 |

| | |
|-----------------------------------------------|------------|
| c. Determinantes de resistencia | 193 |
| i. Identificación de genes | 193 |
| ii. Identificación de secuencias de inserción | 195 |
| iii. Mapeo de mutaciones | 196 |
| 5. Identificación de plásmidos | 198 |
| CONCLUSIONES | 203 |
| BIBLIOGRAFÍA | 207 |
| PUBLICACIONES | 233 |

ÍNDICE DE TABLAS

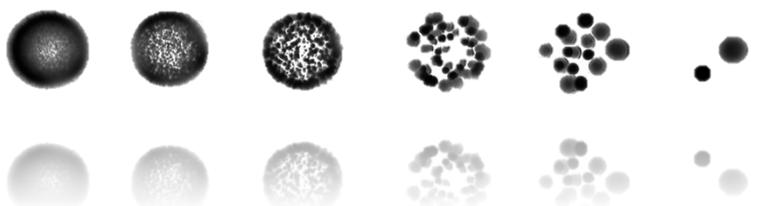
| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabla 1: Relación de especies identificadas del género <i>Acinetobacter</i> _____ | 7 |
| Tabla 2: Principales factores de virulencia y procesos asociados a ellos de <i>A. baumannii</i> __ | 28 |
| Tabla 3: Relación de cepas de <i>Acinetobacter</i> empleadas_____ | 87 |
| Tabla 4: Composición del medio Luria_____ | 88 |
| Tabla 5: Composición del medio BHI _____ | 88 |
| Tabla 6: Composición del medio MH _____ | 89 |
| Tabla 7: Composición de tampones y soluciones empleadas en el PFGE_____ | 101 |
| Tabla 8: Relación de primers utilizados _____ | 114 |
| Tabla 9: Puntos de corte para <i>Acinetobacter</i> spp. definidos por EUCAST _____ | 121 |
| Tabla 10: Relación de CMI ₅ (mg/L) de cada cepa de <i>A. baumannii</i> _____ | 122 |
| Tabla 11: Relación de CMI ₅₀ y CMI ₉₀ para el conjunto de <i>A. baumannii</i> _____ | 123 |
| Tabla 12: Relación de CMI ₅ (mg/L) de cada cepa de <i>A. pittii</i> _____ | 123 |
| Tabla 13: Relación de CMI ₅₀ y CMI ₉₀ para el conjunto de <i>A. pittii</i> _____ | 124 |
| Tabla 14: Número final de bacterias cultivables en LA de <i>A. baumannii</i> _____ | 130 |
| Tabla 15: Número final de bacterias cultivables en LA+P de <i>A. baumannii</i> _____ | 132 |
| Tabla 16: Número final de bacterias cultivables en LA de <i>A. pittii</i> _____ | 134 |
| Tabla 17: Número final de bacterias cultivables en LA+P de <i>A. pittii</i> _____ | 136 |
| Tabla 18: Genes determinantes de resistencia antibiótica de <i>A. baumannii</i> _____ | 168 |
| Tabla 19: Genes determinantes de resistencia antibiótica de <i>A. pittii</i> _____ | 169 |
| Tabla 20: Sustratos antibióticos de las bombas de expulsión en cepas de <i>A. baumannii</i> __ | 169 |
| Tabla 21: Sustratos antibióticos de las bombas de expulsión en cepas de <i>A. pittii</i> _____ | 170 |
| Tabla 22: Tiempo de generación de las cepas de <i>Acinetobacter</i> _____ | 172 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 1: Árbol filogenético de gammaproteobacterias _____ | 7 |
| Figura 2: Árbol filogenético del género <i>Acinetobacter</i> _____ | 8 |
| Figura 3: Número de genes de <i>A. baumannii</i> correspondientes a cada categoría _____ | 15 |
| Figura 4: Representación de estructura de los componentes del LPS _____ | 30 |
| Figura 5: Representación de las fases de formación de biofilm _____ | 36 |
| Figura 6: Principales órganos y/o tejidos afectados por <i>A. baumannii</i> _____ | 39 |
| Figura 7: Representación de familias de bombas de expulsión de Gram negativas _____ | 53 |
| Figura 8: Vías de transmisión de <i>A. baumannii</i> en el ambiente hospitalario _____ | 64 |
| Figura 9: Número de genomas procariotas secuenciados y depositados en NCBI _____ | 71 |
| Figura 10: Representación de la composición del pan-genoma _____ | 78 |
| Figura 11: Esquema de placa de 96 pocillos empleada para microdilución _____ | 90 |
| Figura 12: Esquema de placa de 24 pocillos _____ | 92 |
| Figura 13: Placa inoculada y desecada en las diferentes superficies de análisis _____ | 92 |
| Figura 14: Curvas de crecimiento de <i>A. baumannii</i> _____ | 119 |
| Figura 15: Curvas de crecimiento de <i>A. pittii</i> _____ | 120 |
| Figura 16: Placa inoculada para lectura de microdilución _____ | 121 |
| Figura 17: Curva de supervivencia relativa de LMG 10559 en medio LA _____ | 126 |
| Figura 18: Curva de supervivencia relativa de HUMV 6207 en medio LA _____ | 127 |
| Figura 19: Curva de supervivencia relativa de LMG 10559 en medio LA+P _____ | 128 |
| Figura 20: Curva de supervivencia relativa de HUMV 6207 en medio LA+P _____ | 129 |
| Figura 21: Curvas de supervivencia individuales de <i>A. baumannii</i> en LA _____ | 130 |
| Figura 22: Curvas de supervivencia individuales de <i>A. baumannii</i> en LA+P _____ | 131 |
| Figura 23: Curvas de supervivencia conjuntas de <i>A. baumannii</i> durante 60 días _____ | 133 |
| Figura 24: Curvas de supervivencia individuales de <i>A. pittii</i> durante 43 días _____ | 134 |
| Figura 25: Curvas de supervivencia individuales de <i>A. pittii</i> en LA+P _____ | 136 |
| Figura 26: Curvas de supervivencia conjuntas de <i>A. pittii</i> durante 60 días _____ | 137 |
| Figura 27: Microscopía confocal de células vivas/muertas de <i>A. baumannii</i> _____ | 139 |
| Figura 28: Microscopía confocal de células vivas/muertas de <i>A. pittii</i> _____ | 140 |
| Figura 29: Fotografías de los pocillos con los biofilms de <i>A. baumannii</i> _____ | 141 |
| Figura 30: Cuantificación de la formación de biofilm de <i>A. baumannii</i> _____ | 142 |
| Figura 31: Fotografías de los pocillos con los biofilms de <i>A. pittii</i> _____ | 144 |
| Figura 32: Cuantificación de la formación de biofilm de <i>A. pittii</i> _____ | 145 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 33: Estimación de la capacidad de recrecimiento en <i>A. baumannii</i> _____ | 147 |
| Figura 34: Estimación de la capacidad de recrecimiento en <i>A. pittii</i> _____ | 148 |
| Figura 35: Ensayo de virulencia en <i>Galleria mellonella</i> _____ | 149 |
| Figura 36: Efecto del suero humano en bacterias sensibles y resistentes _____ | 150 |
| Figura 37: Efecto de condiciones de estrés en <i>A. baumannii</i> en suero humano _____ | 151 |
| Figura 38: Análisis SEM de <i>A. baumannii</i> sobre bata de laboratorio _____ | 152 |
| Figura 39: Perfil PFGE de <i>Acinetobacter</i> _____ | 153 |
| Figura 40: Productos de PCR de plásmidos de <i>Acinetobacter</i> _____ | 154 |
| Figura 41: Reconstrucción de PLACNET de los genomas de <i>A. baumannii</i> _____ | 156 |
| Figura 42: Reconstrucción de PLACNET de los genomas de <i>A. pittii</i> _____ | 157 |
| Figura 43: Composición del pan-genoma de 9 cepas de <i>Acinetobacter</i> _____ | 158 |
| Figura 44: Composición del pan-genoma de <i>A. baumannii</i> y <i>A. pittii</i> _____ | 159 |
| Figura 45: Representación PanGP de perfiles de pan-genoma _____ | 160 |
| Figura 46: Árboles filogenéticos de las especies <i>A. baumannii</i> y <i>A. pittii</i> _____ | 161 |
| Figura 47: Árbol filogenético del género <i>Acinetobacter</i> _____ | 161 |
| Figura 48: Matriz de distancia evolutiva entre cepas de <i>Acinetobacter</i> _____ | 162 |
| Figura 49: Comparativa de genomas circulares de <i>Acinetobacter</i> _____ | 163 |
| Figura 50: Comparativa de genomas circulares de <i>A. baumannii</i> y <i>A. pittii</i> _____ | 164 |
| Figura 51: Distribución de genes de <i>A. baumannii</i> en subsistemas _____ | 165 |
| Figura 52: Distribución de genes de <i>A. pittii</i> en subsistemas _____ | 166 |
| Figura 53: Distribución de genes en subsistemas _____ | 167 |
| Figura 54: Alineamiento y mapeo de mutaciones en <i>gyrA</i> en <i>A. baumannii</i> _____ | 171 |
| Figura 55: Alineamiento y mapeo de mutaciones en <i>gyrA</i> en <i>A. pittii</i> _____ | 171 |
| Figura 56: Alineamiento y mapeo de mutaciones en <i>parC</i> en <i>A. baumannii</i> _____ | 171 |
| Figura 57: Alineamiento y mapeo de mutaciones en <i>parC</i> en <i>A. pittii</i> _____ | 171 |

ABREVIATURAS



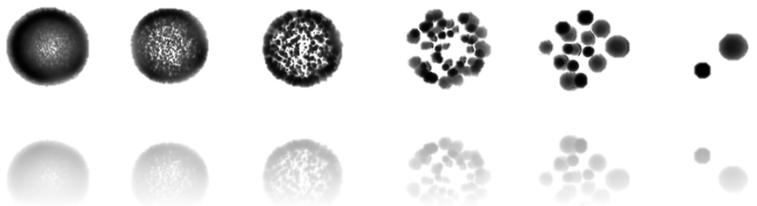
| | |
|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| ABC | ATP-binding cassette |
| AbOmpA | Proteína de membrana externa A de <i>A. baumannii</i> |
| Acb | <i>Acinetobacter calcoaceticus-baumannii</i> |
| ADCs | Cefalosporinas derivadas de <i>Acinetobacter</i> |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| AFLP | Análisis de polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados |
| AIF | Factor inductor de la apoptosis |
| ANI | Media de identidad de nucleótidos |
| ARDRA | Análisis de restricción de ADN ribosomal |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| ARNr | Ácido ribonucleico ribosómico |
| ARNt | Ácido ribonucleico transferente |
| ATCC | Colección Americana de Cultivo Tipo |
| ATP | Adenosín trifosfato |
| BHI | Infusión de cerebro-corazón |
| BRIG | BLAST ring image generator |
| CARD | Comprehensive Antibiotic Research Database |
| CDC | Centro de Control de Enfermedades |
| CDS | Secuencias codificantes |
| CEIC | Comité Ético de Investigación Clínica de Cantabria |
| CGN | Conservación del orden y orientación génica |
| CLSI | Instituto de Estándares de Laboratorio Clínico |
| cm² | Centímetro cuadrado |
| CMI | Concentración mínima inhibitoria |
| CPS | Polisacárido capsular |
| CRAB | <i>Acinetobacter baumannii</i> resistente a carbapenémicos |
| CV | Cristal violeta |
| DAP | Ácido meso-diaminopimélico |
| DDH | Análisis de hibridación ADN-ADN |
| dNTPs | Desoxinucleótidos |
| DO | Densidad óptica |
| EGMs | Elementos genéticos móviles |
| EMAs | Enzimas modificadoras de aminoglucósidos |
| EPOC | Enfermedad pulmonar obstructiva crónica |
| ESBLs | β -lactamasas de espectro extendido |
| EU | Clones europeos |
| EUCAST | Comité Europeo de Antibiograma |
| <i>g</i> | Fuerza centrífuga relativa o fuerza <i>g</i> |
| <i>g</i> | Gramos |
| <i>g/L</i> | Gramos por litro |
| GGDC | Calculador distancias genoma-genoma |
| GI | Isla genómica |
| GR | Grupo plasmídico |

| | |
|-------------------|---------------------------------------------------|
| h | Horas |
| H-NS | Proteínas asociadas a nucleoide |
| HGAP | Hierarchical Genome Assembly Process |
| HGAP3 | Hierarchical Genomic Assembly Process 3 |
| HUMV | Hospital Universitario Marqués de Valdecilla |
| In | Integrón |
| <i>Inc</i> | Incompatibilidad |
| IS | Secuencia de inserción |
| ITUs | Infecciones del tracto urinario |
| kb | Kilobases |
| kV | Kilovoltio |
| LA | Luria agar |
| LA+P | Luria agar con piruvato sódico |
| LMG/BCCM | Colecciones coordinadas Belgas de microorganismos |
| LPS | Lipopolisacárido |
| MATE | Multidrug and toxic compound extrusion |
| Mb | Megabases |
| MbH | Mueller-Hinton |
| MBLs | Metalo- β -lactamasas |
| MCL | Maximum Composite Likelihood |
| MDR | Multirresistente |
| MEGA | Molecular Evolutionary Genetic Analysis |
| MFS | Major facilitator superfamily |
| mg | Miligramos |
| mg/L | Miligramos por litro |
| min | Minutos |
| MITEs | Miniature inverted-repeat transposable element |
| mm | Milímetro |
| mM | Milimolar |
| NA | Numerical aperture (confocal) |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information |
| NGS | Secuenciación de nueva generación |
| nm | Nanómetro |
| nt | Nucleótidos |
| O/N | <i>Overnight</i> |
| OAg | Antígeno O |
| °C | Grados centígrados |
| OMP | Proteína de membrana externa |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| OMVs | Vesículas de membrana externa |
| OXA | Oxacilinas |
| p/v | Peso por volumen |
| PACE | Proteobacterial antimicrobial compound efflux |
| PanGP | Pan-Genome Profile Analyze Tool |

| | |
|----------------------------|------------------------------------------------------------|
| PanOCT | Pan-genome ortholog clustering tool |
| pb | Pares de bases |
| PBP | Proteínas de unión a penicilina |
| PBRT | Tipado basado en PCR-replicón |
| PBS | Tampón fosfato salino |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PCR/ESI-MS | PCR acoplada a espectrometría de masas para producir iones |
| PDR | Pan-resistente |
| PFGE | Pulse Field Gel Electrophoresis |
| PLACNET | Plasmid constellation networks |
| PSKs | Sistemas de muerte post-segregacional |
| QACs | Compuestos de amonio cuaternario |
| QRDR | Región determinante de resistencia a quinolonas |
| QS | Quorum sensing |
| RAST | Rapid Annotation using Subsystems Technology |
| REL | Relaxasas |
| Rep | Replicasa |
| RGI | Resistance Gene Identifier |
| RI | Isla de resistencia |
| RIP | Proteínas de iniciación de la replicación |
| RND | Resistance-nodulation-cell division |
| ROS | Especies reactivas de oxígeno |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| RT | Temperatura ambiente |
| s | Segundos |
| SD | Desviación estándar |
| SE | Error estándar |
| SEM | Microscopía electrónica de barrido |
| SMR | Small multidrug resistance |
| SMRT | Single-molecule real-time |
| t | Tiempo |
| T4SS | Sistema de secreción de tipo IV |
| T6SS | Sistema de secreción de tipo VI |
| T^a | Temperatura |
| TBE | Tampón Tris/borato/EDTA |
| TE | Tampón Tris/EDTA |
| TLR | Receptor tipo Toll |
| Tn | Transposón |
| U | Unidad de actividad enzimática |
| U/μl | Unidad de actividad enzimática por microlitro |
| UCIs | Unidades de Cuidados Intensivos |
| UFC | Unidad formadora de colonia |
| UV | Ultravioleta |
| V | Voltios |

| | |
|------------------|---------------------------------------|
| v/v | Volumen por volumen |
| VBNC | Viable no cultivable |
| WGS | Whole Genome Sequencing |
| XDR | Extremadamente resistente |
| μ | Constante de velocidad de crecimiento |
| $\mu\text{g/ml}$ | Microgramos por mililitro |
| μl | Microlitro |
| μm | Micrómetro |
| μM | Micromolar |

RESUMEN



Acinetobacter es un género de bacterias Gram negativas, en su mayoría de origen ambiental, que cuenta en la actualidad con más de 60 especies validadas. Algunas de las especies de este género tienen relevancia clínica por ser patógenos humanos, y su presencia se ha visto incrementada en los últimos años como causantes de infecciones nosocomiales tales como neumonías y bacteriemias. La especie más importante hasta el momento es *A. baumannii*, aunque existen otras como *A. pittii* y *A. nosocomialis* que también han adquirido relevancia clínica.

Pese a que estas bacterias son generalmente consideradas de baja patogenicidad, su tratamiento supone un reto en la práctica clínica ya que son capaces de adquirir de manera rápida y eficaz resistencia a la mayoría de antimicrobianos, limitando de manera significativa las opciones terapéuticas. Este problema es tal que la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha situado a *A. baumannii* como el principal patógeno contra el que hay una prioridad crítica para el desarrollo de nuevos antibióticos. Además, en el ambiente hospitalario presentan una gran capacidad de supervivencia y persistencia, pudiendo sobrevivir en condiciones de desecación y privación de nutrientes durante largos periodos de tiempo, lo que aumenta de manera significativa la probabilidad de contaminación e infección. Esto, ligado a la resistencia que presentan a desinfectantes y biocidas, y a la diseminación de determinantes de resistencia mediante plásmidos, hace que estos microorganismos sean muy difíciles de erradicar.

Por esto, el objetivo principal del presente trabajo ha sido estudiar la capacidad de supervivencia de cepas clínicas de *A. baumannii* y *A. pittii* bajo condiciones desfavorables y conocer si su virulencia se ve afectada tras largos periodo de estrés; así como realizar un análisis genómico de las mismas.

Para ello, se emplearon superficies propias de un hospital (como plástico, cristal o bata de laboratorio) con el fin de comparar la supervivencia de las bacterias en las diferentes condiciones; se empleó el modelo animal *Galleria mellonella* para ensayos de virulencia y suero humano con el fin de evaluar la resistencia de dichas bacterias al mismo. También se usaron plataformas de Illumina de PacBio para secuenciar los genomas de las bacterias a estudio, y analizar el resistoma y el contenido plasmídico de las mismas.

En lo que a supervivencia se refiere, las cepas de *Acinetobacter* fueron capaces de sobrevivir semanas en desecación y/o bajo privación de nutrientes y no mostraron estrategias de supervivencia específicas como el denominado estado viable no cultivable. Se observó

también que tras esas condiciones mantuvieron la capacidad de adherirse a superficies abióticas, que su virulencia sobre el modelo animal no disminuyó y que no perdieron la capacidad de resistir al suero humano.

Por otro lado, a nivel genómico todas las cepas mostraron una elevada homología y un gran repertorio de determinantes de resistencia. La presencia de plásmidos entre las cepas fue variable, así como el tamaño de los mismos.

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral respecto a la persistencia de *Acinetobacter* en el ambiente hospitalario nos han permitido aumentar el conocimiento acerca de los mecanismos de supervivencia de estas bacterias y la respuesta del organismo a las condiciones de estrés. También ha permitido incrementar la comprensión de la composición génica y genómica de estas dos especies bacterianas.

Acinetobacter is a Gram negative bacteria genus, mostly with an environmental origin, which currently has more than 60 validated species. Some of these species have clinical relevance for being human pathogens, and their presence as cause of nosocomial infections such as pneumonia and bacteraemia has been increased in recent years. To date, the most important species is *A. baumannii*, although there are others that have also acquired clinical relevance, such as *A. pittii* and *A. nosocomialis*.

Despite these bacteria are sometimes considered as low virulence pathogens, their treatment is a challenge in the clinical practice since they are capable of acquiring resistance to most antimicrobials in a fast and efficient way, thus limiting therapeutic options. This problem is such that the World Health Organization (WHO) has considered *A. baumannii* as the main pathogen of critical priority, for which the development of new antibiotics are urgently needed. In addition, these bacteria have a great capacity for survival and persistence in the hospital environment, being able to survive in desiccation and starvation for long time, which significantly increases the probability of both contamination and infection. This, together with both disinfectants and biocides resistance, and the presence of plasmids, makes these microorganisms difficult to eradicate.

Therefore, the objective of the present work was both to study the survival capacity of *A. baumannii* and *A. pittii* clinical strains under unfavourable conditions and to know if their virulence is affected after long periods of stress conditions; as well as to perform genomic analysis of them.

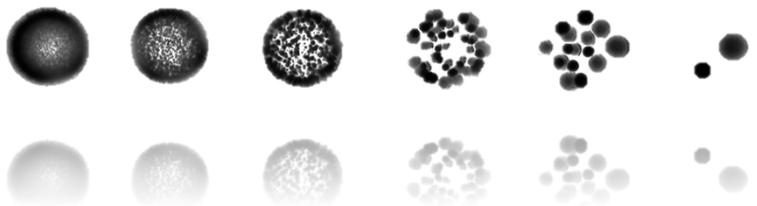
For this purpose, hospital-like surfaces (such as plastic, glass or laboratory coat) were used to compare bacterial survival under different conditions. The *Galleria mellonella* animal model was used for virulence assays, and human sera were used to evaluate serum resistance. Illumina and PacBio platforms were also used to sequence bacterial genomes, and to analyse their resistome and plasmid content.

Acinetobacter strains were able to survive for weeks under desiccations and/or starvations conditions, despite not showing survival strategies such as the so-called viable non-cultivable state. It was also observed that they maintained the ability to adhere to abiotic surfaces, their virulence on the animal model did not decrease; and they retain the resistance to non-immune human serum, after being under stressful conditions.

On the other hand, at the genomic level, all strains showed a high homology and a large repertoire of resistance determinants. Both the presence and the size of plasmids between the strains were variable.

The results obtained in this PhD work about *Acinetobacter* persistence in hospital environment have allowed us to increase knowledge about the bacterial survival mechanisms and their response to stress conditions. They have also allowed to increase the understanding of the genetic and genomic composition of these two bacterial species.

INTRODUCCIÓN



1. Género *Acinetobacter*

Acinetobacter es un género de gammaproteobacterias no móviles, caracterizadas por una gran versatilidad metabólica y capacidad para la transformación natural (Robinson *et al.*, 2010). El género se compone de coco-bacilos Gram negativos de entre 1 y 2,5 μm normalmente, que adquieren una forma de menor diámetro en la fase estacionaria de crecimiento (Bergogne-Bérézin y Towner, 1996). Los organismos pertenecientes a este grupo son estrictamente aeróbicos, no fermentativos, no móviles, catalasa positivos y oxidasa negativos. Aunque se consideran no móviles porque carecen de movilidad tipo “swimming”, sí se ha visto que son capaces de llevar a cabo movilidad tipo “twitching” (movimiento intermitente y desigual), probablemente debido a la presencia de fimbrias en su superficie (Brisou y Prevot, 1954). Este tipo de movilidad se considera necesaria en el proceso de formación de “biofilm” (biocapa), del mismo modo que se cree que permite a las células diseminarse por los tejidos del hospedador durante la infección (O’Toole y Kolter, 1998). No obstante, la movilidad del género se puso en entredicho cuando se observó la capacidad de algunas especies (*A. calcoaceticus*) para moverse sobre placas de agar. Posteriormente, se observó que también otras especies como *A. baumannii* disponen de movilidad diferencial como respuesta a estímulos lumínicos, quorum sensing (QS) o captación de hierro (McConnell *et al.*, 2013). Actualmente, todas las formas de movilidad descritas para *A. baumannii* parecen dependientes de la síntesis de la poliamina 1,3-diaminopropano (Wilharm *et al.*, 2013). Los organismos de este grupo se consideran ubicuos en la naturaleza, pudiendo aislarse de la mayoría de suelos y ambientes acuáticos.

El género *Acinetobacter* fue descrito por primera vez en 1911 por el microbiólogo Beijerinck (Beijerinck, 1911). Lo aisló a partir de una muestra de suelo empleando un medio enriquecido con acetato de calcio, motivo por el que describió originalmente la especie que observó como *Micrococcus calco-aceticus*. Desde ese momento, los componentes del género han sido clasificados bajo diferentes nombres (*Bacterium anitratum*, *Herellea vaginicola*, *Mima polymorpha*, *Moraxella lwoffii*), dificultando así el establecimiento de la epidemiología y la relevancia clínica real de estos organismos (Towner, 2009). Las bacterias de ese género han sufrido muchos cambios taxonómicos en su historia, cambiando incluso la familia a la que pertenecen, de *Neisseriaceae* a la familia *Moraxacellaceae* (Henriksen 1973; Fournier y Richet, 2006). El nombre del género *Acinetobacter*, el cual proviene del griego *akinetos* que significa no móvil, no se aceptaría hasta 1968 (Baumann *et al.*, 1968), aunque se propusiera en 1954 por Brisou y Prevot para diferenciarlo de los organismos móviles pertenecientes al género

Achromobacter (Howard *et al.*, 2012). Finalmente, el nombre se aprobó y su uso se extendió en 1971 por el Subcomité de Taxonomía de *Moraxella* y bacterias relacionadas, en el Comité Internacional de Nomenclatura Bacteriana, creando un grupo homogéneo en cuanto a ser oxidasa negativo (Lessel, 1971).

Más de una década después, se desarrolló un sistema fenotípico para la identificación de especies de *Acinetobacter*, que resultó ser útil para la identificación de la mayoría, aunque no de todas las especies del género con exactitud. Concretamente no era capaz de separar adecuadamente las especies *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, gen. sp. 3 (*A. pittii*) y gen. sp. 13TU (*A. nosocomialis*) (Dijkshoorn *et al.*, 2007). Pese a la dificultad de clasificar a los integrantes de ese grupo, que pasó a agruparse en el complejo *A. calcoaceticus-baumannii* (Acb), empleando estudios de hibridación ADN-ADN (Tjernberg y Ursing, 1989), se definieron 12 genoespecies, reorganizando así 74 de las 85 cepas del género hasta ese momento descritas, mientras que 11 de ellas no pudieron ser identificadas inequívocamente (Bouvet y Grimont, 1986). A 6 de esas especies genómicas les otorgaron nombre de especie: *Acinetobacter baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. haemolyticus*, *A. johnsonii*, *A. junni* y *A. lwoffii*.

Históricamente, organismos del género *Acinetobacter* se han clasificado como patógenos asociados a instalaciones sanitarias (Bergogne-Bérézin y Joly-Guillou, 1991), considerándolos responsables del 1 al 3% de todas las infecciones nosocomiales, así como del 2 al 10% de las infecciones en las unidades de cuidados intensivos (UCIs) (Russo *et al.*, 2009). Es importante destacar que la incidencia de las infecciones de dichos patógenos está aumentando en todo el mundo.

a. Especies

Actualmente, este grupo cuenta con un total de más de 60 especies validadas, y más de una decena propuestas (<http://www.bacterio.net/acinetobacter.html>, -abril 2019-; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy/>, -abril 2019-).

| Espece | Referencia | Fuente |
|-----------------------|---------------------------------------------------|-------------------------|
| <i>A. albensis</i> | Krizova <i>et al.</i> , 2015 | Suelo y agua |
| <i>A. anitratus</i> | Brisou, 1957 | Animal |
| <i>A. antiviralis</i> | Lee <i>et al.</i> , 2009 | Raíces de planta |
| <i>A. apis</i> | Kim <i>et al.</i> , 2014; Oren y Garrity, 2014 | Tracto intestinal abeja |

| | | |
|-----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|--------------------------------|
| <i>A. baumannii</i> ^{Acb} | Bouvet y Grimont, 1986 | Humano y animales |
| <i>A. baylyi</i> | Carr <i>et al.</i> , 2003 | Suelo |
| <i>A. beijerinckii</i> | Nemec <i>et al.</i> , 2009 | Humano, animales, suelo y agua |
| <i>A. bereziniae</i> | Bouvet y Grimont, 1986; Nemec <i>et al.</i> , 2010 | Humano |
| <i>A. bohemicus</i> | Krizova <i>et al.</i> , 2014 | Suelo y agua |
| <i>A. boissiei</i> | Álvarez-Pérez <i>et al.</i> , 2013 | Néctar floral |
| <i>A. bouvetii</i> | Carr <i>et al.</i> , 2003 | Lodo activado |
| <i>A. brissonii</i> | Anandham <i>et al.</i> , 2010; Oren y Garrity, 2011 | Turba |
| <i>A. calcoaceticus</i> ^{Acb} | Baumann <i>et al.</i> , 1968; Bouvet y Grimont, 1986 | Suelo |
| <i>A. celticus</i> | Radolfova-Krizova <i>et al.</i> , 2016 | Suelo y agua |
| <i>A. colistiniresistens</i> | Nemec <i>et al.</i> , 2017 | Humano |
| <i>A. courvalinii</i> | Nemec <i>et al.</i> , 2016 | Humano y animal |
| <i>A. defluvii</i> | Hu <i>et al.</i> , 2017 | Aguas residuales hospitalarias |
| <i>A. dispersus</i> | Nemec <i>et al.</i> , 2016 | Diverso |
| <i>A. dijksboorniae</i> ^{Acb} | Cosgaya <i>et al.</i> , 2016 | Humano |
| <i>A. equi</i> | Poppel <i>et al.</i> , 2016 | Caballo |
| <i>A. gandensis</i> | Smet <i>et al.</i> , 2014 | Caballo, ganado y agua |
| <i>A. gernerii</i> | Carr <i>et al.</i> , 2003 | Lodo activado |
| <i>A. glutaminosificans</i> * | Roberts <i>et al.</i> , 1972: no publicado | |
| <i>A. grimontii</i> (sinónimo <i>A. junii</i>) | Carr <i>et al.</i> , 2003 | Lodo activado |
| <i>A. guangdongensis</i> (sinónimo <i>A. indicus</i>) | Feng <i>et al.</i> , 2014 | Minas de menas de plomo-cinc |
| <i>A. guilloniae</i> | Nemec <i>et al.</i> , 2010 | Humano y suelo |
| <i>A. gyllenbergii</i> | Nemec <i>et al.</i> , 2009 | Humano |
| <i>A. haemolyticus</i> | Bouvet y Grimont, 1986 | Humano |
| <i>A. halotolerans</i> | Dahal <i>et al.</i> , 2017; Oren y Garrity, 2017 | Suelo |
| <i>A. harbinensis</i> | Li <i>et al.</i> , 2014 | Agua de río |
| <i>A. idrijaensis</i> ^t | Campos-Guillen <i>et al.</i> , 2014 | Mina de mercurio |
| <i>A. indicus</i> (sinónimo <i>A. guangdongensis</i>) | Malhotra <i>et al.</i> , 2012 | Vertedero |
| <i>A. johnsonii</i> | Bouvet y Grimont, 1986 | Humano y animal |
| <i>A. junii</i> | Bouvet y Grimont, 1986 | Humano |
| <i>A. koukii</i> | Choi <i>et al.</i> , 2013 | Suelo |

| | | |
|----------------------------------------|-----------------------------------------------------|---------------------------|
| <i>A. kyonggiensis</i> ^t | Lee y Lee, 2010 | Agua residual |
| <i>A. lactucae</i> ^{Acb} | Rooney <i>et al.</i> , 2016 | Lechuga |
| <i>A. larvae</i> | Liu <i>et al.</i> , 2017 | Tracto intestinal polilla |
| <i>A. hwoffit</i> ^t | Brisou y Prévot, 1954 | Humano y animal |
| <i>A. marinus</i> ^t | Yoon <i>et al.</i> , 2007 | Agua marina |
| <i>A. modestus</i> | Nemec <i>et al.</i> , 2016 | Diverso |
| <i>A. movanagherensis</i> ^t | Moore <i>et al.</i> , 2014 | Agua de tanque piscícola |
| <i>A. nectaris</i> | Álvarez-Pérez <i>et al.</i> , 2013 | Néctar floral |
| <i>A. nosocomialis</i> ^{Acb} | Nemec <i>et al.</i> , 2011; Oren y Garrity, 2011 | Humano |
| <i>A. oleivorans</i> ^t | Kang <i>et al.</i> , 2011 | Arrozal |
| <i>A. oryzae</i> ^t | Chaudhary <i>et al.</i> , 2012 | Arroz |
| <i>A. pakistanensis</i> | Abbas <i>et al.</i> , 2014 | Agua residual |
| <i>A. parvus</i> | Nemec <i>et al.</i> , 2003 | Humano y animales |
| <i>A. piscicola</i> | Liu <i>et al.</i> , 2018 | Perca |
| <i>A. pittii</i> ^{Acb} | Nemec <i>et al.</i> , 2011; Oren y Garrity, 2011 | Humano y suelo |
| <i>A. plantarum</i> ^t | Du <i>et al.</i> , 2016 | Planta de trigo |
| <i>A. populi</i> | Piao <i>et al.</i> , 2015 | Corteza de <i>Populus</i> |
| <i>A. pragensis</i> | Radolfova-Krizova <i>et al.</i> , 2016b | Agua y suelo |
| <i>A. proteolyticus</i> [*] | Nemec <i>et al.</i> , 2016 | Humano |
| <i>A. psychrotolerans</i> [*] | Yamihara <i>et al.</i> , 2005 no publicado | |
| <i>A. puyangensis</i> | Li <i>et al.</i> , 2013 | Corteza de <i>Populus</i> |
| <i>A. qingfengensis</i> | Li <i>et al.</i> , 2014 | Corteza de <i>Populus</i> |
| <i>A. radioresistens</i> | Nishimura <i>et al.</i> , 1988 | Humano, suelo y algodón |
| <i>A. refrigeratus</i> ^t | Feng <i>et al.</i> , 2014 | Superficie ambiental |
| <i>A. rhizospearae</i> [*] | Reix <i>et al.</i> , 2003 no publicado | |
| <i>A. rudis</i> | Vaz-Moreira <i>et al.</i> , 2011 | Leche fresca |
| <i>A. schindleri</i> | Nemec <i>et al.</i> , 2001 | Humano |
| <i>A. seifertii</i> ^{Acb} | Nemec <i>et al.</i> , 2015 | Humano |
| <i>A. seohaensis</i> ^t | Yoon <i>et al.</i> , 2007 | Agua marina |
| <i>A. septicus</i> ^t | Kilic <i>et al.</i> , 2008 | Humano |
| <i>A. soli</i> | Kim <i>et al.</i> , 2009 | Suelo, humano |
| <i>A. tandoii</i> | Carr <i>et al.</i> , 2003 | Lodo activado |
| <i>A. tjernbergiae</i> | Carr <i>et al.</i> , 2003 | Lodo activado |
| <i>A. townneri</i> | Carr <i>et al.</i> , 2003 | Lodo activado |
| <i>A. ursingii</i> | Nemec <i>et al.</i> , 2001 | Humano |
| <i>A. variabilis</i> | Krizova <i>et al.</i> , 2015 | Humano y animal |

| | | |
|-----------------------|----------------------------------|----------------------------|
| <i>A. venetianus</i> | Vanechoutte <i>et al.</i> , 2009 | Agua marina |
| <i>A. vivianii</i> | Nemec <i>et al.</i> , 2016 | Diversa |
| <i>A. wubouensis</i> | Hu <i>et al.</i> , 2018 | Agua residual hospitalaria |
| <i>A. xiamensis</i> * | Lai y Shao, 2006 no publicado | |

Tabla 1: Relación de especies identificadas del género *Acinetobacter* (hasta abril 2019).

*: no válidamente publicado en el momento del depósito de la secuencia correspondiente

t: publicada efectivamente pero no válidamente bajo las normas de “The International Code of Nomenclature of Bacteria” (Bacteriological Code)

Acb: perteneciente al complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*

Pese a ser un género con una divergencia significativa de otras gammaproteobacterias (Figura 1), dentro de él algunas especies se encuentran estrechamente relacionadas, como son las especies que conforman el ya citado complejo *Acb* (Robinson *et al.*, 2010). Las especies que lo componen (*A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. nosocomialis* y *A. pittii*) presentan tantas similitudes fenotípicas que a veces resulta difícil diferenciarlas. Análisis filogenéticos de secuenciación genómica (WGS por las siglas en inglés –Whole Genome Sequencing-) han mostrado que ese complejo se caracteriza por tener un origen monofilético (Sahl *et al.*, 2013) (Figura 2). Aunque la mayoría de las cepas de dicho complejo se asocian a infecciones nosocomiales y son las especies de mayor relevancia clínica, gran parte de los representantes del clado *calcoaceticus* son cepas ambientales.

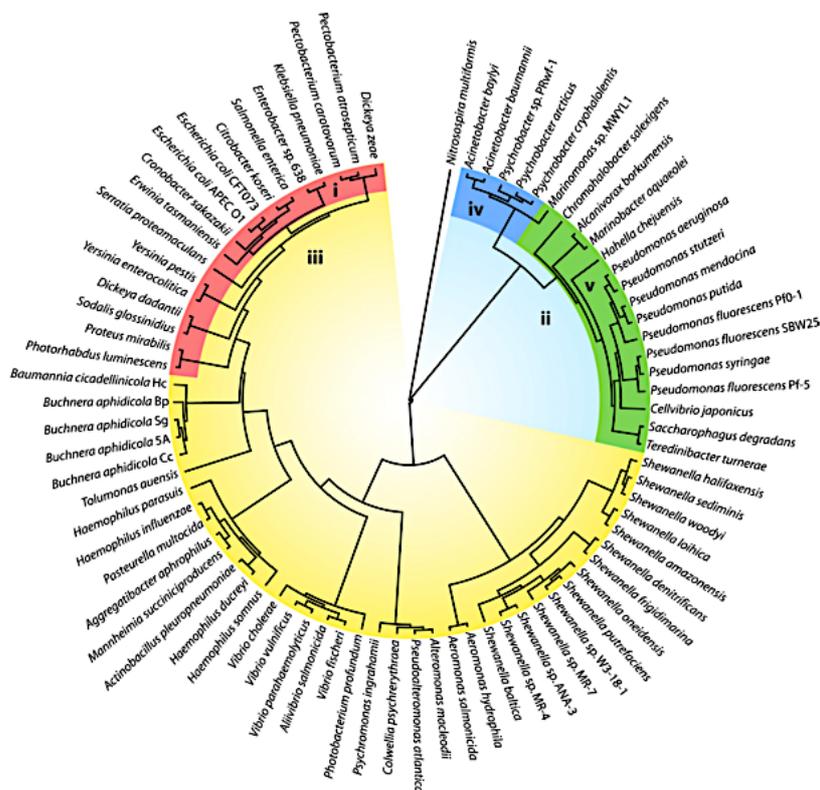


Figura 1: Rama de árbol filogenético basado en secuencias ARNr 16S de gammaproteobacterias. El género *Acinetobacter* se encuentra en el grupo iv, sombreado en azul. (Robinson *et al.*, 2010).

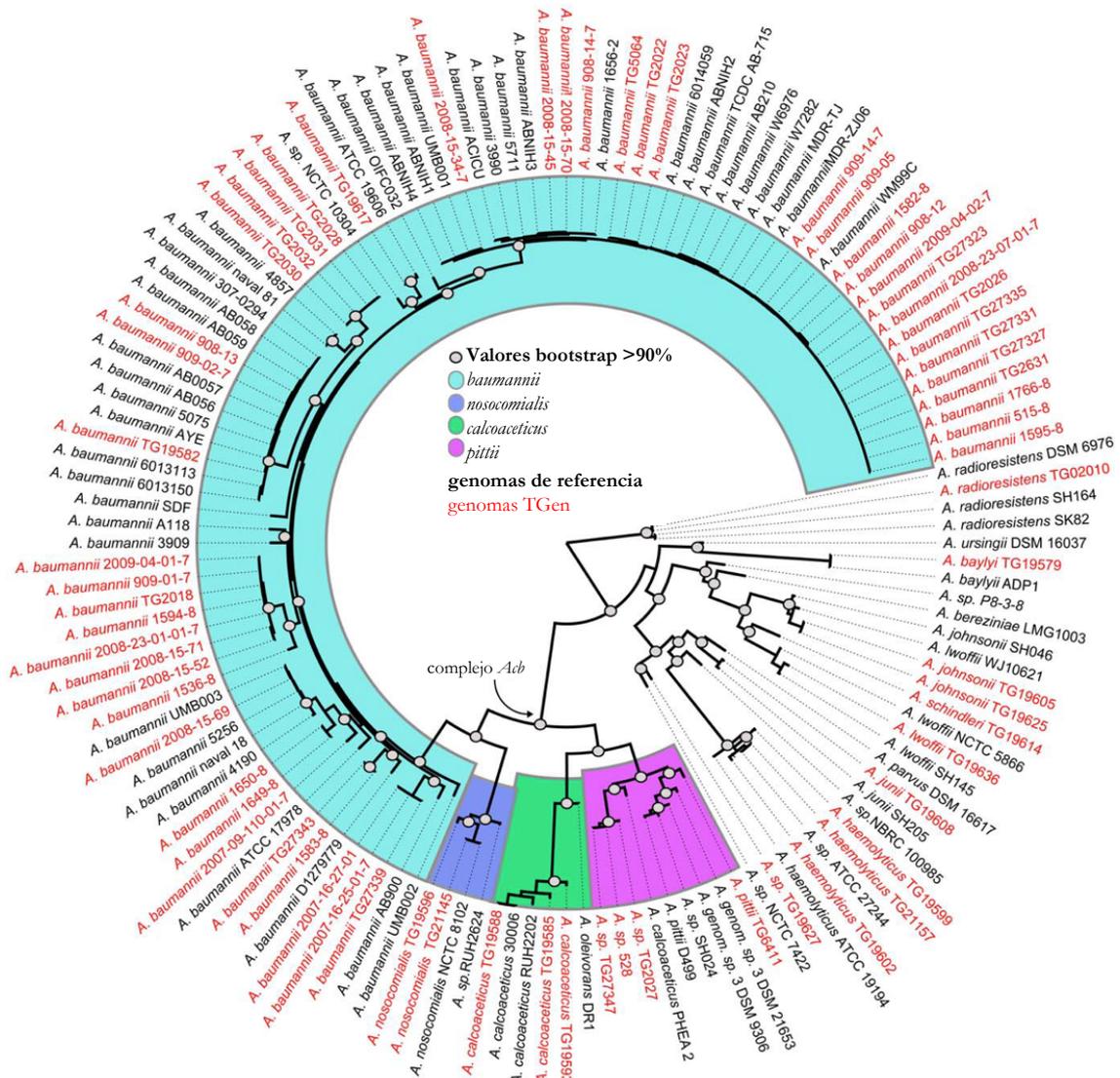


Figura 2: Árbol filogenético de 136 genomas secuenciados del género *Acinetobacter*. La raíz se ha fijado en el clado *A. radioresistens*. Los genomas del complejo *Acb* están coloreados de manera diferencial por clado (azul claro para *A. baumannii*, azul oscuro para *A. nosocomialis*, verde para *A. calcoaceticus* y rosa para *A. pittii*). Adaptado de Sahl *et al.*, (2013)

Aunque los miembros del género *Acinetobacter* se identifican como Gram negativos, en ocasiones resulta difícil llevar a cabo dicha tinción, por lo que se identifican erróneamente como Gram positivos. Por otro lado, no hay un test metabólico completo que permita distinguir este género de las demás bacterias del grupo. Por este motivo, los test fenotípicos por sí solos resultan inefectivos para identificar todas las especies que pertenecen al género (Bergogne-Berezin y Towner, 1996; Sahl *et al.*, 2013).

Para identificar las cepas descubiertas más recientemente, la implementación de métodos de diagnóstico molecular más avanzados han facilitado su identificación a nivel de especie (Nemec *et al.*, 2011; Howard *et al.*, 2012; Atrouni *et al.*, 2016). Entre estos métodos se

encuentran: análisis de restricción del ADN ribosomal (ARDRA) (Dijkshoorn *et al.*, 1998), análisis de alta resolución basado en los polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP) (Janssen *et al.*, 1997; Dijkshoorn *et al.*, 2007), ribotipado (Gerner-Smidt 1992), PCR acoplada a espectrometría de masas para producir iones (PCR/ESI-MS) (Ecker *et al.*, 2006), análisis de secuencias de genes 16S y 23S (Chang *et al.*, 2005), análisis de secuencia del gen *rpoB* y sus espacios flanqueantes (Gundi *et al.*, 2009), análisis genómicos, análisis en multiplex del gen *gyrB* (Higgins *et al.*, 2007; Higgins *et al.*, 2010), e incluso la variabilidad de espaciadores CRISPR puede usarse para tipar algunas especies, pero solo en combinación con otros marcadores (Touchon *et al.*, 2014). Específico de la especie *A. baumannii* es la detección del gen *bla_{OXA-51}*, codificante de la carbapenamasa OXA-51 (Turton *et al.*, 2006).

Los distintos métodos genotípicos presentan ventajas y desventajas, en función del objetivo del análisis realizado. Asimismo, los ensayos que emplean AFLP son útiles más allá de la identificación de especie, puesto que además, permiten la identificación de cepas (tipado) y de clones, aunque no pueden ser comparados entre laboratorios. En el caso de los resultados de ensayos ARDRA se obtienen patrones que sí resultan comparables entre los distintos laboratorios. Por último, los análisis de secuencias (16S, *rpoB*) permiten establecer las relaciones entre microorganismos, por lo que los resultados son universalmente comparables (Dijkshoorn *et al.*, 2007).

- **Taxones principales**

Los componentes del género *Acinetobacter* fueron reconocidos por primera vez como patógenos nosocomiales durante la década de los 70. En los primeros estudios, los aislados eran susceptibles a la mayoría de antibióticos empleados en la rutina; mientras que, en las últimas décadas, han aparecido aislados multirresistentes de *Acinetobacter* spp., cambio que se podría atribuir al uso de antibióticos de amplio espectro (Towner, 2009).

Towner define tres poblaciones principales dentro del grupo *Acinetobacter*, atendiendo a su epidemiología y ecología:

- *A. baumannii* y especies relacionadas: aislados multirresistentes encontrados principalmente en hospitales en brotes. Caracterizados por ser capaces de colonizar e infectar a pacientes hospitalizados.

- *A. johnsonnii*, *A. lwoffii* y *A. radiorestiens*: aislados sensibles a antibióticos que forman parte de la flora comensal normal de humanos y animales, además de la flora de descomposición de muchos productos alimenticios.
- *A. calcoaceticus* y *A. johnsonnii*: aislados sensibles a antibióticos encontrados principalmente en el ambiente, el suelo y las aguas residuales.

Dicha organización atiende a criterios epidemiológicos y ecológicos, aunque no tiene sentido teniendo en cuenta los perfiles de resistencia de las cepas ATCC (McConnell *et al.*, 2013), ni desde un punto de vista taxonómico, como el complejo *Acb*. Aunque este último desde una perspectiva clínica no es apropiado porque combina las tres especies de mayor relevancia clínica con la especie ambiental *A. calcoaceticus* (Dijkshoorn *et al.*, 2007).

La especie clínica más relevante dentro del género es *A. baumannii*, aunque otras especies, particularmente pertenecientes al complejo *A. calcoaceticus-baumannii*, como cepas multirresistentes de *A. pittii* y *A. nosocomialis* están adquiriendo importancia en los últimos años (Bergogne-Bérézin y Towner, 1996; Lin y Lan, 2014; Atrouni *et al.*, 2016). Por otro lado, se han descrito cepas de *A. lwoffii* y *A. baylyi* que son también patógenas. Incluso, una especie que se considera ambiental como es *A. calcoaceticus*, se ha descrito como causante de neumonía y bacteriemia (Atrouni *et al.*, 2016).

- **Ecología y hábitat**

De un modo general, los miembros del género *Acinetobacter* se consideran ubicuos en la naturaleza (Bergogne-Bérézin y Joly-Guillou, 1991; Peleg *et al.*, 2008), predominantemente aislados de suelo, agua, aguas residuales, alimentos y animales, como se recoge en la Tabla 1 (Fournier y Richet, 2006; Kurcik-Trajkovska, 2009). Hace décadas, algunos autores ya encontraron que a partir de una gran variedad de muestras de suelo y agua podían aislarse diferentes especies de *Acinetobacter*, si se usaban los medios de enriquecimiento adecuados (Baumann, 1968). No obstante, pese a esos tempranos hallazgos, no todas las especies del género parecen tener hábitat natural en el ambiente, sino que las cepas de mayor relevancia se han aislado de muestras clínicas. Cabe destacar que la mayoría de las especies aisladas de muestras humanas tienen, al menos, cierta relevancia como patógenos (Peleg *et al.*, 2008).

En las últimas décadas, se han llevado a cabo diversos estudios para identificar las especies de *Acinetobacter* que forman parte de la flora epitelial humana fisiológica, en zonas como manos, ingles, frente, orejas y vesículas en dedos del pie, principalmente (Atrouni *et al.*,

2016). Del mismo modo, el ambiente ha sido estudiado para identificar la presencia de organismos de este género. Lo que estos autores vieron fue que, además de en muestras de suelo y agua, cultivos de vegetales resultaron positivos para este tipo de bacterias (Berlau *et al.*, 1999). Los alimentos son una importante fuente conocida de bacilos Gram negativos. De hecho, más del 50% de las cepas aisladas de frutas y vegetales pertenecen al complejo *A. calcoaceticus-baumannii* (Fournier y Richet, 2006).

Especies posteriormente descubiertas por Carr *et al.* (2003), aisladas de muestras de lodo, no han sido encontradas en humanos, a saber *A. baylyi*, *A. bouvetii*, *A. grimontii*, *A. tjernbergiae*, *A. townery* y *A. tandoii* (Carr *et al.*, 2003). En el extremo opuesto se encuentran las especies *A. schindleri* y *A. ursingii* aisladas únicamente de especímenes humanos (Nemec *et al.*, 2001). Existen otras que parecen compartirse entre humanos y otros animales, como perros, como el caso de *A. parvus* (Nemec *et al.*, 2003). Hay ciertos nichos, como el néctar de flores o el tracto intestinal de peces, en los que *Acinetobacter* parece ser el género predominante en cuanto al número de aislados de las muestras (Atrouni *et al.*, 2016), lo que podría explicarse por la producción de compuestos antibacterianos y su adaptación a condiciones nutricionales.

Podría considerarse a nivel de género un grupo ubicuo en la naturaleza, aunque parece haber una distinción bastante marcada entre las especies que son propiamente ambientales y las que son clínicas, a pesar de que haya especies capaces de compartir ambos nichos. Especies como *A. calcoaceticus* se han encontrado en agua, tierra y vegetales, y recientemente también como causantes de infección humana; *A. pittii* también se ha aislado en agua, suelo, animales, carne y vegetales, y además en muestras de piel humana; *A. jonhsonii* en agua y suelo, y en muestras de heces y piel humana; *A. lwoffii* y *A. radioresistens* en piel humana; *A. guilloniae* en suelo, agua y vegetales, y también en el tracto intestinal humano; *A. nosocomialis* se ha encontrado en muestras de piel humana en unos estudios sí pero no en otros (Peleg *et al.*, 2008; Atrouni *et al.*, 2016). Curiosamente, se ha visto una colonización diferencial entre estaciones, lo que podría explicar también la variabilidad estacional vista en la prevalencia de *A. baumannii* en muestras clínicas (McDonald *et al.*, 1999). De hecho, existen datos que sugieren que tanto los cambios climáticos como la contaminación tienen la capacidad de modificar la distribución específica del ambiente (Atrouni *et al.*, 2016).

Acinetobacter baumannii no parece ser un organismo típicamente ambiental, pese a que ha sido localizado en ciertas muestras de suelo y vegetales, ya que al menos en Europa el

número de portadores de esta bacteria en la comunidad es bastante bajo (Dijkshoorn *et al.*, 2005). La piel humana parece ser el hábitat natural de algunas especies, principalmente *A. lwoffii* y *A. johnsonii*, probablemente también *A. pittii* y *A. radioresistens* aunque se han encontrado solo en pacientes hospitalizados (Seifert *et al.*, 1997); ya que el alcance de la colonización por *Acinetobacter* spp. parece aumentar a lo largo del curso de hospitalización. La capacidad de este género para dominar en muchos nichos ecológicos distintos lleva a algunos autores a considerar a estas bacterias como “malas hierbas microbianas” (Atrouni *et al.*, 2016).

2. *Acinetobacter baumannii*

En las últimas décadas, *A. baumannii* ha emergido como un importante patógeno humano; hasta el punto de considerarse como uno de los patógenos más exitosos dentro de los sistemas sanitarios modernos (Lin y Lan, 2014). La principal característica de este microorganismo es la gran capacidad que posee de desarrollar resistencia a un amplio número de antimicrobianos usados actualmente en la clínica, lo que en numerosas ocasiones obliga a recurrir a antibióticos de último recurso (colistina) (Perez *et al.*, 2011), para los que también se han encontrado cepas resistentes (Goic-Barisic *et al.*, 2016). De hecho, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó en 2017 el listado de patógenos resistentes para las que se requieren con urgencia nuevos antibióticos, encabezando la lista *A. baumannii* resistente a carbapenémicos (CRAB), dentro de la categoría de prioridad crítica, seguido de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos y enterobacterias resistentes a carbapenémicos y a cefalosporinas de 3ª generación (*Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Serratia* y *Proteus*) (Tacconelli *et al.*, 2017).

Estudios en diferentes países han determinado que el patógeno *A. baumannii* causa en torno al 9% de las infecciones en las unidades de cuidados intensivos (Perez *et al.*, 2011), establecido por otros autores como un abanico de 2 a 10% de las mismas (Russo *et al.*, 2010), siendo los variables porcentajes debidos a diferentes determinantes de resistencias que poseen los distintos aislados. De hecho, ha sido descrito por la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas como uno de los patógenos hospitalarios más significativos, al que se le atribuyen entre el 2 y el 10% de todas las infecciones nosocomiales causadas por bacterias Gram negativas (Nowak y Paluchowska, 2016), y del 1 al 3% de todas las infecciones nosocomiales (Russo *et al.*, 2010). No obstante, destaca como causante de infección y/o colonización de pacientes que requieren cuidados médicos en periodos largos, así como en aquellos pacientes asociados a ventilación, catéteres o sondas (Perez *et al.*, 2011).

Acinetobacter baumannii, como bacteria patógena, suele encontrarse en tejidos húmedos, tales como membranas mucosas o áreas de piel que estén expuestas por alguna herida o traumatismo. Esas áreas dañadas en las que aparezcan ampollas hemorrágicas, pueden verse asociadas a procesos necróticos que van seguidos de bacteriemia. Si dichas lesiones no se tratan, pueden derivar en septicemia y producir, en consecuencia, la muerte del paciente. En dichas infecciones epiteliales necróticas, *A. baumannii* puede verse asociado a patógenos que en su mayoría son Gram negativos, denominados co-patógenos, como son

Klebsiella pneumoniae, o *Enterococcus faecalis* e incluso con levaderas como *Candida albicans* (Howard *et al.*, 2012). Esos microorganismos pueden favorecer el desarrollo del proceso patológico causando una infección necrótica, favoreciendo así la entrada de *A. baumannii* en el torrente sanguíneo y sugiriendo un efecto sinérgico en la virulencia (Perez *et al.*, 2011).

Si bien es cierto que es un patógeno asociado principalmente con lesiones o infecciones epiteliales, es una bacteria que se encuentra en menos del 3% de la microbiota humana natural; aunque se ha encontrado ADN de la bacteria en hasta en un 22% de las muestras de piojos de personas sin hogar (La Scola y Raoult, 2004).

a. Genética de *A. baumannii*

i. Genomas

Hoy en día, el análisis de genomas obtenidos mediante secuenciación de alto rendimiento, ha aumentado la capacidad para evaluar la microevolución de los patógenos bacterianos (Adams *et al.*, 2010). En esto se incluye la caracterización de la aparición de mutaciones puntuales asociadas con el desarrollo de resistencia antibiótica a lo largo de la infección de un solo paciente, la evaluación de la distribución mundial de patógenos con genomas suficientemente estables, así como el grado de evolución de aquellos más variables. Los resultados de estos análisis han llevado a que se acuñe el concepto “pan-genoma”, en el que se diferencia entre los genes del genoma central o “core” (compartidos por todos los aislados de una especie) y los genes del genoma accesorio (presentes solo en un subgrupo) (Adams *et al.*, 2010).

La mayoría de los factores de virulencia conocidos para *A. baumannii* se localizan en el genoma central, encontrándose presentes también en otras especies del género (Touchon *et al.*, 2014).

En los últimos años, se han realizado secuenciaciones de genomas completos de varias cepas, junto con comparativas de los mismos, para elucidar las bases genéticas de la resistencia a antibióticos del patógeno *A. baumannii* (Adams *et al.*; 2008; Vallenet *et al.*, 2008; Adams *et al.*, 2010; Krizova *et al.*, 2011; Peleg *et al.*, 2012; Lin y Lan, 2014; López *et al.*, 2016). Los análisis han estado especialmente enfocados al grado de variabilidad entre genomas, junto con la adquisición y/o transferencia de determinantes de resistencia entre diferentes cepas, cuyos resultados ponen de manifiesto la flexibilidad genética de esta especie ya que

muestran una gran capacidad añadida para modificar, reestructurar o eliminar genes propios (Peleg *et al.*, 2008; McConnell *et al.*, 2013; Lin y Lan, 2014).

Dichos análisis de comparación de genomas entre distintas cepas de *A. baumannii* muestran que el genoma central se compone de unos 2800 genes, un número relativamente bajo, mientras que el genoma accesorio varía de 600 a más de 1000 genes, dependiendo de la cepa (Peleg *et al.*, 2012; McConnell *et al.*, 2013). El tamaño del genoma corresponde al número de genes, que en esta especie se encuentra en un rango de 3,7 a 4 Mb, con un abanico de genes comprendido desde 3400 a más de 3800 en las distintas cepas (Peleg *et al.*, 2012). En lo que a categorías se refiere (Figura 3), el mayor número de genes se clasifica dentro de las categorías de transporte de moléculas y metabolismo, suponiendo más del 35% de los genes (incluyendo procesamiento de aminoácidos, carbohidratos, lípidos, nucleótidos, coenzimas e iones inorgánicos). Las categorías con menos genes son aquellas destinadas a los mecanismos de defensa, a la motilidad celular y al control del ciclo celular, con menos de 50 genes en cada una de ellas.

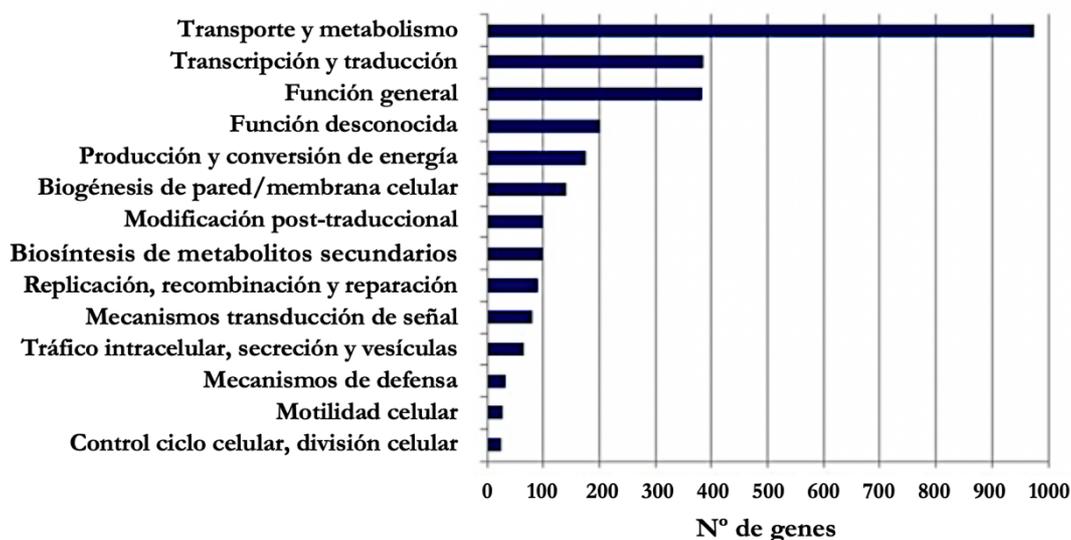


Figura 3: Número de genes de *A. baumannii* correspondientes a cada categoría. Adaptado de Peleg *et al.*, 2012.

Pese a englobarse esta especie en un género que por definición es no-móvil, dispone de varios genes en el genoma común de movilidad celular como los que incluyen los pili de tipo IV y su ensamblaje, los genes de biogénesis de fimbrias y los genes de movilidad *twitching*, importantes en la retracción de los pili (Tomaras *et al.*, 2003; Peleg *et al.*, 2012; Vijayakumar *et al.*, 2016). Por otro lado, en análisis comparativos entre especies del género, se ha visto que las especies clínicamente relevantes comparten la presencia del operón *csu*, que no aparece

en las no patogénicas. Dicho operón se compone de 6 genes que codifican para proteínas que participan en el sistema de ensamblaje de pili por chaperonas. Además, parece ser relevante en la adherencia a superficies abióticas y en la formación del biofilm (Peleg *et al.*, 2012). Otro enfoque para comparar los genomas de varias especies es el que ofrece Vallenet y colaboradores (2008) en un estudio, en el que analizaron varias cepas de *A. baumannii* (clínicas y ambientales) y una cepa de la especie *A. baylyi*, de origen ambiental. En base a las similitudes, principalmente las catabólicas, los autores sostienen la hipótesis de que el suelo parece ser el nicho ecológico primario de la especie *A. baumannii* (Vallenet *et al.*, 2008).

ii. Elementos genéticos móviles (EGM)

Al analizar los genomas de *A. baumannii*, al igual que en muchos otros patógenos, es común encontrar elementos móviles, que pueden portar genes de resistencia en su estructura, como pueden ser islas genómicas, plásmidos, o elementos transponibles. La captura, acumulación y diseminación de genes de resistencia están en gran medida debidas a las acciones de elementos genéticos móviles, que hace referencia a elementos que promueven la movilidad de ADN intracelular así como aquellos que permiten la movilidad de ADN intercelular.

Las secuencias de inserción (IS por las siglas en inglés, **insertion sequence**) y los transposones (Tn) son segmentos de ADN discretos capaces de moverse a sí mismos casi al azar (a nueva posición en la misma molécula de ADN o a una nueva) y, capaces además de asociarse con genes de resistencia (Partridge *et al.*, 2018). Las secuencias de inserción son generalmente pequeños elementos móviles que portan un gen de transposasa (a veces dos) y cuya transposición puede ocurrir por mecanismos de copia y pega o de corta y pega. La importancia de los transposones, entre otras características, es su capacidad de transmitir los mecanismos de resistencia cromosómicos a plásmidos, y viceversa (Wong *et al.*, 2017). Los transposones más destacables en *A. baumannii* son los de tipo Tn7, como Tn403 y Tn6022 que se componen de islas de resistencia. Además, datos recientes parecen indicar que los fagos favorecen la transferencia horizontal de determinantes de resistencia (Touchon *et al.*, 2014).

Una isla genómica (GI por las siglas en inglés, **genomic island**) es una región inestable y distintiva de un cromosoma bacteriano que ha sido adquirido vía transferencia horizontal, un punto caliente para la sucesiva integración genética, en muchos casos flanqueados por repeticiones directas (Adams *et al.*, 2010; Partridge *et al.*, 2018). Las GIs varían en tamaño y

pueden ser clasificadas basadas en el fenotipo que codifican. Por ejemplo, GIs que contienen varios determinantes de resistencia se refieren como islas de resistencia (RI por sus siglas en inglés, *resistance island*), mientras que las que contienen factores de virulencia suelen denominarse islas de patogenicidad (Adams *et al.*, 2010; Partridge *et al.*, 2018). Otro tipo de elemento móvil son los integrones (In), que usan recombinación de sitio específica para mover genes de resistencia entre varios sitios definidos (Partridge *et al.*, 2018). Como estos tipos de EGMs están a menudo presentes en múltiples copias en distintas localizaciones en un genoma, pueden también facilitar la recombinación homóloga.

En una de las cepas de referencia de *A. baumannii* (cepa AYE), endémica en Francia, se encontró una isla de resistencia de 86 kb con un grupo de 45 genes de resistencia (AbaR1), que se considera una de las más grandes conocidas hasta ese momento (Fournier *et al.*, 2006). Se cree que AbaR1, junto con las demás islas de resistencia descritas para *A. baumannii*, deriva de la estructura original AbaR3 (Lin y Lan, 2014). Gracias a estudios de comparativa de secuencias, se ha llegado a la conclusión de que la estructura tipo mosaico de AbaR1 es el resultado de la sucesiva adquisición de fragmentos de ADN de diferentes hospedadores; por lo que diferentes presiones de selección podrían tomar forma en la organización de islas genómicas de acuerdo con la disponibilidad de nutrientes en su ambiente natural (Vallenet *et al.*, 2008; Perez *et al.*, 2011). Las islas de resistencia antibiótica (AbaR y AbGR11) se encuentran en los clones globales de *A. baumannii*, y están basadas en los transposones asociados a Tn7 y Tn402; los cuales pueden dirigir a un sitio específico, y suelen estar generalmente insertados en el gen cromosómico *comM* que codifica una proteína de función desconocida con un dominio ATPasa, pero también se han encontrado en plásmidos (Partridge *et al.*, 2018). Diferentes genes de resistencia se insertan en diferentes puntos de las estructuras centrales de los transposones o “backbones”.

Otro tipo de estructura son los casetes génicos, elementos móviles pequeños que consisten en un único (u ocasionalmente dos) gen, típicamente sin un promotor y con un sitio de recombinación *attC*. Pueden existir en forma circular libre pero son formas no replicativas que se encuentran normalmente en un integrón, caracterizado con un gen *intl*, un sitio de recombinación *attI* y un promotor (Partridge *et al.*, 2018). *Intl* codifica una recombinasa sitio-específica que cataliza la recombinación entre el sitio *attI* del integrón y el sitio *attC* de un casete, y lo inserta en el integrón en la orientación que permita su expresión. Muchos casetes pueden ser insertados en el mismo integrón para crear un array de casetes (a veces incorrectamente llamado casete) que puede conferir también multirresistencia

(Partridge *et al.*, 2018). Se han identificado una amplia variedad de casetes génicos que contienen genes de resistencia, siendo los clínicamente más relevantes los que portan genes que codifican para β -lactamasas o enzimas modificadoras de aminoglucósidos. Es común que los casetes se expresen por un único promotor fuerte, sobre todo cuando se encuentran integrados en plásmidos, por lo que crean así un gradiente de transcripción de todos sus genes (San Millan y MacLean, 2017). De hecho, los casetes génicos con integrones se encuentran entre los genes de los plásmidos más expresados.

Un caso particular son los MITEs (**m**iniature **i**nverted-**r**epeat **t**ransposable element), derivados no autónomos (no autotransponibles) de secuencias de inserción bacterianas o transposones que retienen la isla de resistencia pero que han perdido partes centrales, incluyendo el gen o genes de transposasa. Estructuras pareadas de MITEs parecen estar involucradas en la movilización de los genes de resistencia (Partridge *et al.*, 2018).

Cada clase de elemento móvil ha contribuido al desarrollo de resistencia antimicrobiana, bien por facilitar la transferencia de genes o por la sobreexpresión de algún gen endógeno (Adams *et al.*, 2008; Adams *et al.*, 2010; Touchon *et al.*, 2014). No obstante, pese a que las islas de resistencia con diferentes determinantes son muy importantes a la hora de fomentar un fenotipo multirresistente, no son un contribuyente universal de tal hecho, sino que pueden darse otros fenómenos como mutaciones en genes cromosómicos, como se expondrá más adelante (Adams *et al.*, 2008). Estudios sobre similitudes de secuencia junto con análisis filogenéticos han confirmado que la mayoría de los genes de resistencia encontrados en esa cepa se han adquirido de bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Salmonella* y *Escherichia* (Fournier *et al.*, 2006; Lin y Lan, 2014).

Por otro lado, recientes estudios han revelado que una de las características más destacables de los genomas de algunas de esas cepas es que portan grandes grupos de genes transferidos horizontalmente que confieren resistencia a muchos antibióticos y metales pesados, los cuales se hallan integrados en un sitio específico, en un gen de ATPasa particular (Krizova *et al.*, 2011; Snitkin *et al.*, 2011). Cabe señalar que la presencia de esas islas genómicas en la ATPasa no es una característica común en todos los aislados, y su ausencia en esa localización no es predictiva de los patrones de sensibilidad antibiótica. Esto resalta la particular flexibilidad del genoma de *A. baumannii*, además de su gran capacidad de integrar material genético foráneo (Fournier *et al.*, 2006; Peleg *et al.*, 2008). Por este motivo, es común encontrar referencias a genes “alien” en el genoma de *A. baumannii*. Esas estructuras de ADN

foráneo se pueden identificar por el uso de codones, que difiere de un modo sustancial del uso propio del hospedador (Karlin, 2001). Estos grupos de genes son relevantes a la hora de detectar las islas genómicas, incluyendo las patogénicas, que contienen genes involucrados en el desarrollo de enfermedades como son los codificantes de invasinas, adhesinas, factores de secreción o toxinas. No obstante, permanece por determinar, cómo de rápida resulta la ganancia o pérdida génica que es común en el contexto de los brotes clínicos (Adams *et al.*, 2010).

En *A. baumannii*, se han descrito muchas familias de secuencias de inserción, incluyendo IS*Aba1*, que está frecuentemente asociada con genes que codifican para β -lactamasas y posee una capacidad de movilización intrínseca (Dijkshoorn *et al.*, 2007; Adams *et al.*, 2010; Nowak y Paluchowska, 2016). Cabe destacar, que pese a que se considera que IS*Aba1* ha sido personalizada para *A. baumannii*, este elemento no está presente en el genoma de todas las cepas analizadas de la especie (como es el caso de la cepa SDF) (Vallenet *et al.*, 2008). Los elementos de inserción de cepas distintas son significativamente diferentes, y se cree que han contribuido a la reducción del tamaño del genoma a través de eventos de recombinación y disrupciones génicas (Vallenet *et al.*, 2008).

La capacidad de *A. baumannii* para ganar determinantes de resistencia enfatiza la importancia de las cepas multirresistentes, pero también de las que no lo son, ya que a corto plazo podrían adquirir dichos genes o actuar como reservorio potencial para variantes antigénicos. Este genoma dinámico pone de manifiesto la importancia de considerar la población entera de cepas de un hospital en los intentos de controlar a este emergente patógeno (Snitkin *et al.*, 2011).

La resistencia a muchos antibióticos en esta especie se ha asociado con diversos linajes internacionales, en concreto con los llamados clones europeos (EU) I y II (Krizova *et al.*, 2011). Como se ha citado anteriormente, se considera a AbaR3 como la estructura genómica original a partir de la cual los AbaRs, hasta ahora conocidos, han derivado en el clon EU I; estructura que podría haber provisto a las cepas de su linaje con una ventaja de selección, facilitando su difusión en los hospitales en los años 70 y 80 (Krizova *et al.*, 2011; Holt *et al.*, 2016). En base a los datos disponibles, se puede decir que AbaR3 es la más extendida del grupo en el espacio y en el tiempo entre las cepas de dicho clon.

AbaR3, y sus subtipos basados en integrones, son algunas de las islas genómicas que se integran en el gen de la ATPasa (Krizova *et al.*, 2011; Partridge *et al.*, 2018). Estos portan

genes que confieren resistencia a los antibióticos usados en los años 70 y 80, incluyendo la primera generación de β -lactámicos, aminoglucósidos, tetraciclinas, cloranfenicol, sulfonamidas y trimetoprim. Sin embargo, recientes aislados de ese linaje portan genes adquiridos mediante transferencia horizontal que confieren resistencia a antibióticos modernos, como a los carbapenémicos. Es el caso del gen *bla_{OXA-23}*, que no se ha localizado en ninguna de las AbaRs integradas en el gen *ATPasa* de dicho clon (Krizova *et al.*, 2011). Otra serie de estudios, en los que se realizó análisis genómico comparativo de cepas aisladas en hospitales de Tailandia y China, muestran que la diseminación de dicho gen podría estar mediada por la transferencia de personas entre esos países (Lin y Lan, 2014).

Junto con *A. baumannii*, muchos miembros del género se encuentran comúnmente en instalaciones sanitarias donde, bajo presión antimicrobiana, el intercambio genético entre ellos podría verse promocionado (Fournier *et al.*, 2006). De hecho, en un estudio realizado por Snitkin y colaboradores (2011), pudieron observar que en el mismo hospital existían distintas cepas causantes de brotes que habían divergido antes de llegar a las instalaciones, lo que sugiere una adaptación continua de dicho patógeno al ambiente hospitalario. La comparativa de dichas cepas epidémicas revelaron la existencia de recombinación homóloga a través del 20% de sus genomas, lo que a su vez aumenta el conjunto de genes responsables de los antígenos de la superficie celular de *A. baumannii* (Snitkin *et al.*, 2011).

Todo ello demuestra la capacidad de *A. baumannii* para alterar su genoma de forma rápida, permitiéndole evadir tanto las defensas naturales del hospedador como la intervención antibiótica.

iii. Plásmidos

Los plásmidos se encuentran ampliamente distribuidos entre procariontes tanto en géneros Gram negativos como Gram positivos, ayudando a las bacterias que los portan a adaptarse a una gran cantidad de diferentes ambientes, condiciones y tipos de estrés. Son importantes vehículos para portar elementos genéticos móviles y genes de resistencia antimicrobiana adquirida, cuyo tamaño varía desde menos de 1 kb a varias megabases, por lo que tienen un importante papel tanto en la evolución como en la ecología microbianas (Carraro y Burrus, 2015; San Millan y MacLean, 2017; Partridge *et al.*, 2018). Una de las pruebas más importantes del poder de los plásmidos, como catalizadores de dicha adaptación, es su participación en la dispersión de resistencias antibióticas entre patógenos clínicos, fenómeno que ha emergido en las últimas décadas como un gran problema sanitario

(Huang *et al.*, 2014; San Millan y MacLean, 2017). No obstante, el papel de los plásmidos en la adquisición de resistencias en el patógeno *A. baumannii* se halla principalmente relacionado con las estructuras de tipo integrón que portan (Fournier y Richet, 2006; Partridge *et al.*, 2018).

Cabe destacar que, la transferencia génica horizontal en todas sus formas, juega un papel fundamental en la rápida diseminación de determinantes de resistencia (islas genómicas mayoritariamente, y plásmidos conjugativos en menor grado) y de adquisición de funciones metabólicas alternativas (Bergogne-Bérézin y Towner, 1996; Carraro y Burrus, 2015; Lean *et al.*, 2016; Cooper *et al.*, 2017). Los plásmidos conjugativos son elementos genéticos extracromosómicos que, junto a los genes necesarios para su propia replicación, mantenimiento y transferencia, portan genes accesorios que codifican rasgos funcionales (resistencia a toxinas, factores de virulencia, capacidades metabólicas) (Stevenson *et al.*, 2018); cuya existencia extracromosómica proviene de su capacidad para replicar y por ello ser heredables en una población creciente de células hospedadoras, que a menudo requiere un cuadro de sistemas de genes dedicados a su herencia vertical eficiente (Partridge *et al.*, 2018). En plásmidos de resistencia, esas regiones accesorias están típicamente formadas por uno o más genes de resistencia, y asociadas con elementos móviles de distintos tipos (IS, Tn y/o In) (Partridge *et al.*, 2018).

Acinetobacter es un género capaz de adquirir resistencias notablemente rápido, alcanzando ratios de aislados multirresistentes que superan el 60% (Cooper *et al.*, 2017); y de mostrar una elevada frecuencia de transformación natural (Fournier y Richet, 2006). De hecho, la presencia de plásmidos cercanos o idénticos, y cepas estrechamente relacionadas de áreas geográficamente dispersas, indican una diseminación global de esos organismos y elementos (Huang *et al.*, 2014).

La especie *A. baumannii* es uno de los patógenos que puede portar genes de resistencia a antimicrobianos en plásmidos, los cuales abarcan tamaños desde los 2 kb hasta los más grandes que superan los 100 kb (Lean y Yeo, 2017). Pese a que estos últimos han sido objeto de más estudio porque presentan muchos genes de resistencia y poseen la capacidad de autotransmitirse; los de menor tamaño también pueden ser portadores de genes de resistencia, por lo que no deberían ser relegados al ostracismo solo por su tamaño (Lean y Yeo, 2017). *Acinetobacter* tiene una elevada tasa de transferencia horizontal, en la que se encuentran muchos genes de resistencia a antibióticos de aislados clínicos que parecen haber

sido adquiridos de otros patógenos humanos recientemente (Cooper *et al.*, 2017). Por esto, los plásmidos no necesitan estar presentes en alta frecuencia para tener impacto en la evolución bacteriana en ambientes temporalmente heterogéneos (Stevenson *et al.*, 2018).

Si bien los plásmidos en *A. baumannii* están menos estudiados que en otros grupos como las enterobacterias, recientemente un grupo de investigación ha realizado un tipado basado en 18 secuencias de plásmidos disponibles hasta ese momento (Bertini *et al.*, 2010; Partridge *et al.*, 2018). Bertini y colaboradores (2010) proponen en su estudio un esquema de clasificación de los plásmidos de esta especie basada en grupos de homología en base a sus replicasas empleando el método PBRT (**P**CR-**b**ased **r**eplicon **t**yping), en el que establecen 19 (GR1 - 19) grupos, aunque un grupo adicional (GR20) ha sido propuesto más recientemente (Partridge *et al.*, 2018). El tipado de plásmidos es una herramienta útil para estudiar la circulación y dispersión plasmídica entre los miembros del género *Acinetobacter* o incluso entre aislados de otros géneros (Bertini *et al.*, 2010). No obstante, pese a que *A. baumannii* es un patógeno importante, sobre todo en instalaciones sanitarias, la información disponible sobre los plásmidos de esta especie es limitada.

La mayoría de los plásmidos en *A. baumannii* están codificados por las proteínas que pertenecen a la superfamilia Rep-3, poseyendo sitios de recombinación específicos (XerC/XerD) flanqueando diferentes fragmentos entre dichos puntos pese a ser plásmidos similares (Lean *et al.*, 2016; Lean y Yeo, 2017; Partridge *et al.*, 2018). Xer es un mecanismo de recombinación sitio específica involucrado en eventos como la integración de fagos. Ese tipo de sitios podría actuar como dianas de recombinación sitio-específicas responsables de la movilización de módulos de genes en plásmidos de *Acinetobacter* (Lean *et al.*, 2016b). De hecho, elementos móviles integrativos que usan las recombinasas XerC/D cromosómicamente codificadas para integrar en dichos sitios específicos se están identificando como vehículos para genes de carbapenemasas (*bla_{NMC}/bla_{IMI}*) (Partridge *et al.*, 2018).

Cuando se habla de plásmidos, no podemos evitar referirnos al “fitness cost” o coste energético que supone dicha estructura para la bacteria hospedadora. Dicho coste, junto con la posible pérdida del plásmido a través de las generaciones, complica la supervivencia del plásmido en la comunidad bacteriana; entendiendo por generaciones a las divisiones celulares, que en el caso de *A. baumannii* es un proceso que conlleva un tiempo que oscila

entre los 15 y los 55 minutos (Hamzah y Sudhakar, 2015; Flores-Fernández *et al.*, 2017; San Millan y MacLean, 2017).

Si bien es cierto, y está bien establecido que los plásmidos causan un coste energético cuando llegan por primera vez a un nuevo hospedador, esa carga puede verse aliviada de manera general a través de mutaciones compensatorias en el propio plásmido y/o en el cromosoma bacteriano (San Millan y MacLean, 2017; Stevenson *et al.*, 2018). De hecho, Stewart y Levin (1977), a través de un modelo matemático concluyeron que la combinación de pérdida de plásmido por crecimiento poblacional, transferencia conjugativa, coste energético y presencia de selección es la que determina si un plásmido podrá o no persistir en una población a través del tiempo (Stewart y Levin, 1977). Al hecho de que los plásmidos persistan, pese a la selección negativa que pudieran tener en contra gracias a la evolución compensatoria, se le conoce como “la paradoja del plásmido” (San Millan y MacLean, 2017).

- **Ciclo plasmídico**

El primer proceso que debe darse para la adquisición de un plásmido es la recepción, entendida como la llegada física del mismo. Dicho proceso puede darse por tres mecanismos principales, siendo estos: transformación, transducción mediada por fago y la conjugación (el más importante) (San Millan y MacLean, 2017). Pese a ser el mecanismo más importante, la transferencia por conjugación puede explicar solo parte de los eventos de transferencia horizontal en *Acinetobacter*, puesto que genes necesarios para ella no están en muchos de los plásmidos secuenciados (Wilharm *et al.*, 2013). Como se expondrá más adelante, otras vías alternativas identificadas en *A. baumannii* para mediar la transferencia de genes de resistencia son la liberación de vesículas de membrana (Wilharm *et al.*, 2013), junto con la transducción por fagos (Huang *et al.*, 2014).

Una vez adquirido, el siguiente proceso relevante en el ciclo plasmídico es su integración. Si los plásmidos permanecen libres, es decir, no se integran, pueden replicarse de forma autónoma, lo que produce un pequeño incremento en la cantidad total del ADN (San Millan y MacLean, 2017). La capacidad de integrarse en el cromosoma del hospedador es algo característico de cada plásmido, bien sea de forma específica para evitar la interrupción arbitraria o con dianas múltiples que permite una integración casi al azar (San Millan y MacLean, 2017). No obstante, la célula receptora puede integrar en el cromosoma solo genes accesorios útiles, haciendo de ese modo que la estructura central plasmídica sea dispensable; de manera que aunque se perdiera el plásmido, se mantendrían algunos

elementos (Kirchner *et al.*, 2013; Stevenson *et al.*, 2018). La pérdida de marcadores de plásmido tras la integración cromosómica de los determinantes de resistencia antimicrobiana, es un proceso relativamente común en el patógeno *A. baumannii* (Fournier y Richet, 2006). Resulta bastante común que los sitios de integración principales sean genes conservados entre especies, lo que permite incrementar el rango del hospedador facilitando que se establezcan y mantengan estables en muchos linajes tras su transferencia (Carraro y Burrus, 2015). Algunos plásmidos son eficientemente mantenidos solo en taxones de bacterias estrechamente relacionadas y son por ello llamados plásmidos de estrecho rango de hospedador; otros, de amplio rango, porque se encuentran o muestran replicación en un amplio número de géneros (Partridge *et al.*, 2018).

La replicación del plásmido comienza en una región definida denominada origen (*ori*), que puede ser activado por un transcrito de ARN o por la unión de una proteína de iniciación o replicasa (Rep) a secuencias reiteradas de ADN repetido llamados *iterones*, normalmente codificada por el propio plásmido como medio de autocontrol en el número de copias (San Millan y MacLean, 2017; Partridge *et al.*, 2018). Aunque los plásmidos codifican sus propias replicasas, normalmente explotan la maquinaria replicativa del cromosoma del hospedador, reclutando polimerasas y helicasas del mismo para la síntesis de ADN propio (San Millan y MacLean, 2017; Partridge *et al.*, 2018). Las interacciones con las proteínas de replicación del hospedador, así como la necesidad de las mismas, son algunos de los factores que limitan el rango de compatibilidad (De Gelder *et al.*, 2007; Partridge *et al.*, 2018). Existen distintos tipos de replicación, que suelen venir definidos por los dominios conservados de las replicasas, entre los que destacan 2 mecanismos: el modo *theta* similar a la replicación del cromosoma circular usado por plásmidos grandes y pequeños; el modo de desplazamiento de hebra en el que ambas cadenas de ADN se replican continuamente en direcciones opuestas desde el origen, más propio de plásmidos pequeños (Partridge *et al.*, 2018). Plásmidos con diversas regiones de replicación son bastante comunes en bacterias Gram negativas, aunque también en Gram positivas, lo que sugiere que fusiones o cointegraciones ente plásmidos es un fenómeno relativamente frecuente.

Una vez replicados, los plásmidos deben ser distribuidos entre las células bacterianas hijas cuando la división tiene lugar para poder mantenerse en la población. La estabilidad del plásmido, entendida como el mantenimiento del mismo en una población bacteriana en ausencia de selección está influenciada por varios mecanismos (De Gelder *et al.*, 2007; Hamzah y Sudhakar, 2015). En primer lugar, la replicación del plásmido incluye factores

codificados tanto por el plásmido como por el hospedador; en segundo lugar, su segregación podría verse elevada en algunas cepas por los efectos negativos del hospedador sobre el particionamiento; en tercer lugar, el coste energético; y, por último, la recaptura de los plásmidos por células segregantes a través de la conjugación (De Gelder *et al.*, 2007). Los plásmidos pequeños suelen encontrarse en un alto número de copias, por lo que la herencia eficiente por ambas células hijas puede conseguirse por segregación al azar. No obstante, los plásmidos grandes es más común que se hallen en bajo número de copias para minimizar su carga en los hospedadores, por lo que normalmente poseen módulos funcionales adicionales que contribuyen a su mantenimiento y estabilidad segregacional, lo que incluye sistemas de resolución (*res*), particionamiento (*par*) y muerte postsegregacional (Partridge *et al.*, 2018). Las proteínas codificadas por el plásmido también pueden tener efecto sobre el coste energético debido a interacciones no deseadas con redes celulares, secuestro de maquinaria replicativa o efectos citotóxicos, como puede ser el caso de los sistemas de muerte post-segregacional (PSKSs). Dichos sistemas son mecanismos del plásmido que normalmente codifican una toxina estable y una antitoxina afín lábil; que, si no se encuentra adecuadamente regulado matará a células segregantes libres del plásmido (San Millan y MacLean, 2017).

- **Conjugación bacteriana**

La propagación de los plásmidos no solo está facilitada a través de la transmisión vertical a las células bacterianas hijas, sino también mediante la transmisión horizontal a otras células bacterianas, principalmente mediante el proceso de conjugación. La conjugación es un mecanismo común en las bacterias Gram negativas, que tradicionalmente se da a través del sistema de secreción de tipo IV (T4SS) que ensambla un *pilus* conjugativo, un apéndice filamentoso de superficie que media la interacción entre la célula donante y la receptora, que está relacionado con la maquinaria conjugativa y media la transferencia génica horizontal (Carraro y Burrus, 2015; Lean *et al.*, 2016; Partridge *et al.*, 2018). Los plásmidos conjugativos (autotransmisibles) poseen sistemas genéticamente complejos para la transferencia horizontal del mismo, lo que aumenta significativamente el tamaño de la estructura central conservada (Partridge *et al.*, 2018). Es un proceso energéticamente caro por la necesidad de formación del canal conjugativo, por lo que la expresión de estos sistemas está estrechamente regulada. Además, constituye un riesgo potencialmente mortal para la bacteria, ya que ciertos bacteriófagos utilizan el sistema T4SS como sitio de unión para invadirla, causando una infección del microorganismo (San Millan y MacLean, 2017). La conjugación juega un papel más importante en la persistencia de los plásmidos cuando la selección positiva es rara, es

decir, la tasa de transferencia de los plásmidos conjugativos aumenta cuando disminuye la frecuencia de pulsos de selección (Stevenson *et al.*, 2018). Dicha selección positiva “pulsada” es una característica común en ambientes contaminados y en tratamientos clínicos con antibióticos. Además, la transferencia génica horizontal se encuentra favorecida cuando existe compatibilidad entre el uso de codones de los genes foráneos y el del hospedador bacteriano, siendo en sí misma una forma de selección (San Millan y MacLean, 2017).

- **Clasificación plasmídica**

La clasificación de los plásmidos se ha basado comúnmente en el fenómeno de incompatibilidad, soportado por la observación de que plásmidos estrechamente relacionados no pueden coexistir establemente en la misma célula; normalmente debido a comunicación cruzada entre sistemas de iniciación de replicación de dos plásmidos. Los plásmidos incompatibles están, por ello, normalmente relacionados y se clasifican en el mismo grupo *Inc* (de incompatibilidad). Debido a la naturaleza laboriosa de los test de incompatibilidad, este proceso se sustituyó por la hibridación, después por el tipado PBRT y últimamente están en auge los ensayos basados en secuenciación (Partridge *et al.*, 2018). Sin embargo, los grupos *Inc* históricos son la base de los sistemas de clasificación ampliamente usados, como los ensayos *in silico* PBRT o la plataforma PlasmidFinder para Enterobacterias.

El aumento en la disponibilidad de métodos de secuenciación de ADN de nueva generación, incluyendo su uso para trazar o seguir brotes de organismos resistentes, ha llevado a una explosión en el número de secuencias genómicas bacterianas. Su análisis subraya la relevancia de los elementos genéticos móviles, y el uso en aumento de esta tecnología para caracterizar patógenos bacterianos presenta una importante herramienta para la comprensión y clasificación de los plásmidos de especies relevantes (Partridge *et al.*, 2018).

b. Patogénesis

El hecho de que la colonización con *A. baumannii* sea mucho más común que la infección, hasta en pacientes susceptibles, enfatiza el hecho de que la patogenicidad de dicha especie se considerase normalmente baja. Si bien, una vez que la infección se desarrolla, puede llegar a ser severa (Bergogne-Bérézin y Towner, 1996; Dijkshoorn *et al.*, 2007). No obstante, actualmente se ha visto que *A. baumannii* contiene factores de virulencia que pueden incrementar su toxicidad bacteriana y patogenicidad, por lo que algunos autores han dejado de considerarlo como un patógeno de bajo grado (Lin y Lan, 2014).

Pese a su relevancia clínica, hasta hace poco tiempo, los estudios enfocados a determinar los factores que contribuyen a la patogénesis de este organismo eran escasos. Sin embargo, sigue sin saberse mucho del auténtico potencial patogénico o del repertorio de factores de virulencia de *A. baumannii* (Howard *et al.*, 2012). Aun así, prerequisites para la supervivencia bacteriana en un hospedador podrían ser la resistencia a las condiciones protectoras de la piel (sequedad, bajo pH, microbiota) y de las membranas mucosas (presencia de mucus, lactoferrina, lactoperoxidasa), e incluso la resistencia a antibióticos si el hospedador está recibiendo tratamiento antimicrobiano (Dijkshoorn *et al.*, 2007)

La secuenciación de nuevos genomas completos, así como la aplicación de manipulación genética para la creación de mutantes y el uso de modelos animales, han sido herramientas cruciales en la identificación de los factores de virulencia que contribuyen a la patogénesis de este microorganismo. Esto ha permitido empezar a poner de manifiesto el modo mediante el cual el patógeno es capaz de persistir largos periodos de tiempo en el ambiente, además de permitir conocer mejor el mecanismo que emplea para interactuar con las células del hospedador (McConnell *et al.*, 2013).

i. Factores de virulencia

Los productos génicos que proporcionan a un microorganismos la capacidad para persistir e invadir a un hospedador particular suelen denominarse como factores de virulencia (Vallenet *et al.*, 2008). Si lo comparamos con otros patógenos Gram negativos, son relativamente pocos los factores de virulencia caracterizados para la especie *A. baumannii*. No obstante, sí que se han identificado algunos factores de virulencia de entre los posibles determinantes de patogenicidad de este microorganismo, como son las proteínas de membrana externa, el lipopolisacárido, los polisacáridos capsulares, las vesículas de membrana externa, las fosfolipasas, las proteínas de unión a penicilina, sistemas de adquisición de hierro mediados por sideróforos, la formación de biofilm y el quorum sensing (Peleg *et al.*, 2012; Nowak y Paluchowska, 2016; Subashchandrabose *et al.*, 2016). De hecho, estudios genómicos comparativos de esta especie patógena con especies ambientales del mismo género han identificado genes involucrados en la biogénesis de *pilus*, adquisición de hierro y metabolismo, quorum sensing y sistemas de secreción de tipo IV que forman parte del “viruloma” de estos organismos, tanto de las cepas sensibles como de las multirresistentes (Gordon y Wareham, 2010). A continuación se desglosan los principales factores de virulencia identificados para esta especie, resumidos en la (Tabla 2).

| Factor de virulencia | Proceso en que participa | Referencia(s) |
|-----------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| OmpA | Adherencia y formación de biofilm | Choi <i>et al.</i> , 2005 |
| Lipopolisacárido | Desencadenante de la respuesta inmunitaria | Luke <i>et al.</i> , 2010 |
| Polisacárido capsular | Evasión sistema inmunitario | Russo <i>et al.</i> , 2010 |
| OMVs | Liberación de moléculas bacterianas en el hospedador | Jin <i>et al.</i> , 2011; Rumbo <i>et al.</i> , 2011 |
| Fosfolipasas | Invasión bacteriana | Jacobs <i>et al.</i> , 2010 |
| PBP | Biosíntesis peptidoglicano | Jacobs <i>et al.</i> , 2010; Russo <i>et al.</i> , 2010 |
| Sideróforos | Adquisición de hierro | Gaddy <i>et al.</i> , 2012 |
| Biofilm | Colonización | Vidal <i>et al.</i> , 1996 |
| Sistema secreción VI | Lisis celular bacteriana | Weber <i>et al.</i> , 2015 |

Tabla 2: Resumen de los principales factores de virulencia y procesos asociados a ellos descritos para *A. baumannii*.

- OmpA

La porina OmpA se ha determinado como uno de los principales causantes del potencial infeccioso del patógeno, siendo por ello también uno de sus factores mejor caracterizados (Howard *et al.*, 2012; Nowak y Paluchowska, 2016). No obstante, las proteínas OmpA son ubicuas en el género *Acinetobacter*, incluyendo especies no patógenas, lo que plantea preguntas sobre su papel exacto (Vallenet *et al.*, 2008).

La proteína OmpA es miembro de las proteínas de membrana externa (Omps -outer membrane protein-) que se une al epitelio del hospedador y sus mitocondrias (Howard *et al.*, 2012). Se sabe que las proteínas de membrana externa de bacterias Gram negativas son claves para la adaptación bacteriana y la patogénesis en células del hospedador (Choi *et al.*, 2005), habiéndose demostrado el papel de las Omps de varios patógenos humanos como *Neisseria gonorrhoeae* y *P. aeruginosa* en la inducción de la apoptosis celular. La apoptosis es un proceso activo de autodestrucción celular dirigida genéticamente. Juega un papel central no solo en el desarrollo y la homeostasis, sino también en la regulación de la respuesta del hospedador durante la infección por microorganismos.

En el caso de *A. baumannii*, la proteína de superficie más abundante es OmpA (AbOmpA), con una masa molecular de 38 kDa. Participa en la permeabilidad a antibióticos y moléculas pequeñas, desempeña funciones en la patogénesis bacteriana induciendo la muerte celular, e interviene en la formación del biofilm.

Algunos autores han descrito que AbOmpA media la adhesión (junto con las fimbrias de la superficie bacteria) e invasión del patógeno en las células epiteliales (principalmente de tracto respiratorio), ya que se une a la superficie de las células y alcanza tanto la mitocondria como el núcleo, haciendo que la primera se hinche y provocando la liberación de citocromo c (una proteína hemo) y de factores inductores de la apoptosis (AIF) que llevan a la formación del apoptosoma contribuyendo de este modo a la muerte apoptótica de la célula (Choi *et al.*, 2008; Pérez *et al.*, 2011; Howard *et al.*, 2012). No obstante, existe cierta controversia sobre estos resultados, lo que podría indicar que no es una característica común de todas las cepas o que es dependiente de las condiciones de ensayo (Lázaro-Díez *et al.*, 2016). La apoptosis de las células epiteliales puede interrumpir el revestimiento de la mucosa y permitir así el acceso de las bacterias o los productos bacterianos a los tejidos (Choi *et al.*, 2005). Por lo que a esta proteína, además de asociarse directamente con la patología pulmonar, se le considera responsable de la diseminación de *A. baumannii* al torrente sanguíneo, estando de ese modo involucrada en la patogénesis de la bacteriemia.

Además de ser la proteína más abundante en la superficie de este patógeno y de contribuir al daño en las células humanas de las vías respiratorias y a la diseminación, se le atribuye también participación en otros aspectos como la motilidad de superficie, la resistencia al complemento y la formación de biofilm (Howard *et al.*, 2012; Nowak y Paluchowska, 2016), siendo estas dos últimas estrategias de supervivencia que pueden ser consideradas como factores de virulencia en potencia.

Existen 3 rutas potenciales de activación del complemento. Una vez activadas esas rutas, las proteínas del complemento se depositan en la superficie de la bacteria en una secuencia precisa que conduce a la muerte de la bacteria invasora por la formación de complejos de ataque a la membrana y la fagocitosis aumentada por la opsonización (Kim *et al.*, 2009). Los reguladores de unión al complemento de las Omps tienen un papel significativo en la activación del complemento circundante entre muchos patógenos Gram negativos. Tras invadir a hospedadores susceptibles, *A. baumannii* es capaz de escapar del ataque del complemento a través de interacciones de Omps con el regulador del complemento de fase fluida, el factor H. Esa unión específica del factor H a distintas Omps de *A. baumannii*, incluida OmpA, contribuye a la resistencia del patógeno a la actividad bactericida del suero humano.

De este modo, se considera a la forma de OmpA unida a la bacteria la que participa en la adherencia y la invasión de las células del hospedador así como en la resistencia al suero; mientras que la forma secretada es la que se cree que induce la muerte de las células a través de las dianas mitocondriales y nucleares (Kim *et al.*, 2009).

- Lipopolisacárido (LPS)

En lo que al lipopolisacárido se refiere, se ha visto que son los carbohidratos de la superficie los que principalmente contribuyen a la virulencia del microorganismo (Luke *et al.*, 2010; Nowak y Paluchowska, 2016).

El LPS compuesto que aparece en la membrana externa de las bacterias Gram negativas consiste típicamente en un dominio de anclaje hidrofóbico denominado lípido A o endotoxina, que constituye la parte de anclaje a la membrana externa de las bacterias Gram negativas y una estructura central de oligosacáridos no repetidos. En dicha estructura se pueden diferenciar la zona interna o core y la región más externa, un polisacárido formado de estructuras repetidas con longitudes variables denominado antígeno O (OAg) (Luke *et al.*, 2010; Steimle *et al.*, 2016) (Figura 4). En concreto, es la región del lípido A la que se considera la más tóxica del LPS, así como desencadenante de la respuesta inmunitaria.

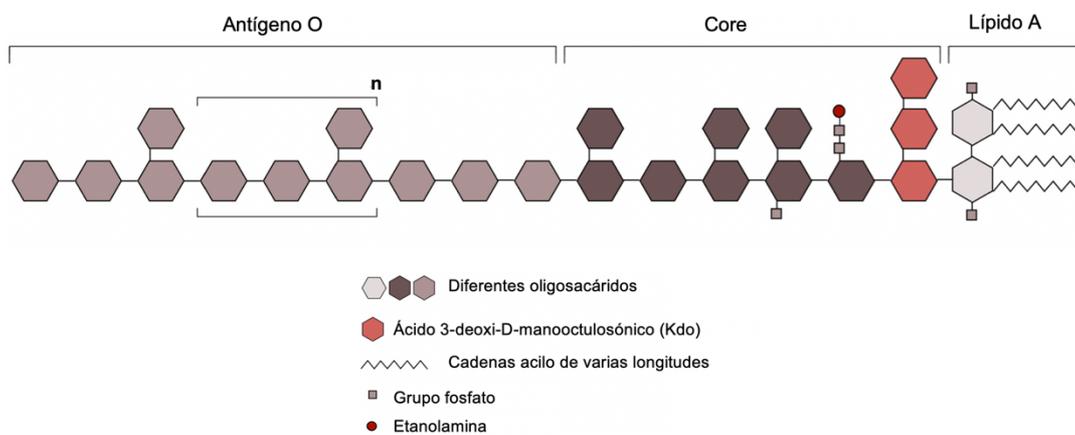


Figura 4: Representación esquemática de estructura de los componentes del lipopolisacárido. Adaptación de Steimle *et al.*, 2016.

Del mismo modo que otras endotoxinas, el LPS se considera un potente estimulador de la señalización inflamatoria por medio de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en células humanas monocíticas, tanto las rutas dependientes de receptores TLR-2 como de TLR-4 (Gordon y Wareham, 2010; Luke *et al.*, 2010; Nowak y Paluchowska 2016). En conjunto, esto señala a la conclusión de que la patología de las infecciones causadas por

A. baumannii podría estar asociada con una respuesta inmunitaria innata exagerada al LPS de dicha bacteria (Nowak y Paluchowska, 2016).

Por otro lado, al LPS también se le atribuye un papel funcional importante en la supervivencia *in vivo*, además de conferir protección frente a los efectos bactericidas del suero humano normal. Tanto para la patogénesis como para la virulencia y la resistencia al suero, es necesario que el LPS disponga de su longitud completa (Luke *et al.*, 2010).

- **Polisacárido capsular (CPS)**

Los polisacáridos capsulares, por su parte, también juegan un papel importante en la protección bacteriana permitiendo de esta manera al patógeno *A. baumannii* evitar la actividad bactericida del complemento (Perez *et al.*, 2011; Nowak y Paluchowska 2016). La cápsula es una capa rígida e impermeable que recubre a algunas bacterias, formada principalmente por glicoproteínas y polisacáridos.

Se considera una protección crítica para *A. baumannii*, que permite el crecimiento óptimo tanto en fluido ascítico como en suero humano, y dado que ambos poseen complemento, dicha estructura parece favorecer la evasión de este componente del sistema inmunitario innato. Algunos autores han mostrado la importancia de la cápsula en dichas bacterias tanto *in vitro* como *in vivo* (Russo *et al.*, 2010). Hasta el momento, dos son los genes que se han predicho necesarios para la polimerización y ensamblaje de la cápsula, una proteína tirosín-quinasa y una proteína de membrana externa que exporta polisacáridos (Russo *et al.*, 2010).

- **Outer Membrane Vesicles (OMVs)**

Una gran variedad de especies bacterianas Gram negativas han mostrado secreción de OMVs durante el crecimiento bacteriano. Las OMVs son nanovesículas típicamente esféricas con un diámetro medio de 20 a 200 nm compuestas por LPS, proteínas (de membrana externa y periplásmicas), fosfolípidos y ácidos nucleicos (ADN o ARN) (Jin *et al.*, 2011; Rumbo *et al.*, 2011). Las OMVs tienen un papel importante en muchos procesos bacterianos como portadoras de moléculas de quorum sensing, liberación de toxinas, inhibición de la maduración de fagosomas en macrófagos y formación de biofilms (Rumbo *et al.*, 2011). Estas vesículas son producidas por células en crecimiento, y no son el producto de lisis o de muerte celular.

Aunque tanto las especies patogénicas como las no patogénicas de bacilos Gram negativos secretan estas vesículas, las cepas patogénicas producen entre 10 y 25 veces más vesículas que las no patogénicas; además, las OMVs de patógenos Gram negativos pueden portar toxinas y factores de virulencia específicas. De este modo, desarrollan una función importante en la patogénesis evitando la necesidad de interacción directa entre los patógenos y las células del hospedador (Jin *et al.*, 2011; Rumbo *et al.*, 2011), ya que durante la infección *in vivo* las bacterias de *A. baumannii* secretan OMVs que son capaces de interactuar por sí mismas con las células del hospedador.

Las OMVs de *A. baumannii* en concreto, podrían representar un vehículo para liberar moléculas bacterianas a las células del hospedador, tales como los factores de virulencia o proteínas asociadas a ella (AbOmpA, CsuA/B, CsuC, CsuD, hemolisina, proteasas, transportador RND, proteína fimbrial) y enzimas biológicamente activas (Perez *et al.*, 2011). La composición proteica de OMVs varía entre diferentes cepas, por lo que se considera que esas composiciones cepa-específicas o perfiles de virulencia en OMVs de *A. baumannii* resultan en las diferencias de virulencia de las cepas de dicho patógeno (Jin *et al.*, 2011).

Las cepas de este patógeno también son capaces de liberar OMVs portadoras de genes de resistencia, como el gen *bla_{OX4-24}* o el gen *bla_{NDM-1}* sin pérdida de viabilidad, constituyendo una posible vía de diseminación de genes de resistencia a antibióticos de impacto clínico (Rumbo *et al.*, 2011; Chatterjee *et al.*, 2017). Por lo tanto, estas estructuras podrían estar involucradas en la transferencia de material genético entre especies bacterianas similares, ya que el ADN intravesicular está protegido de la acción de nucleasas.

De modo que este proceso de secreción vesicular facilita la transferencia genética horizontal y la protección de las células bacterianas de la respuesta inmunitaria así como de su estimulación, contribuyendo de ese modo a la inmunopatología de la bacteria (Nowak y Paluchowska, 2016).

- **Fosfolipasas**

Las fosfolipasas se consideran factores de virulencia debido a que son capaces de degradar los fosfolípidos de las células del hospedador, promoviendo con ello la invasión bacteriana tras la degradación de la membrana plasmática eucariota. En concreto, la fosfolipasa D se ha asociado con la capacidad de supervivencia del patógeno en suero, con la invasión de células epiteliales y con una mayor patogénesis (Nowak y Paluchowska, 2016).

Aunque resulta difícil predecir *a priori* cuántos factores afectan a la capacidad del organismo para proliferar en suero, la fosfolipasa D es un factor de virulencia bien caracterizado que se ha sugerido como participante en la diseminación hematogénica de patógenos bacterianos (Jacobs *et al.*, 2010). Existen otras proteínas importantes, como la fosfolipasa C, que se secreta por las bacterias e incrementa la toxicidad sobre las células epiteliales causando muerte celular (Howard *et al.*, 2012).

Dado que la fosfolipasa D de *A. baumannii* se considera un factor de virulencia, agentes capaces de inhibir su actividad podrían poseer potencial terapéutico, ya que además de participar en la invasión celular y la resistencia al suero, parece jugar un papel importante en el desarrollo de bacteriemia y en la colonización de órganos viscerales (Jacobs *et al.*, 2010). Todos los genomas públicamente disponibles de esta especie contienen múltiples fosfolipasas.

- **PBPs (Penicillin Binding Proteins)**

Las proteínas de unión de la penicilina (PBPs) son las responsables de la biosíntesis del peptidoglicano, que contribuye a la formación de la pared bacteriana cuya principal función es la estabilidad celular; además, proporciona una vía de resistencia frente a varias fuerzas físicas (Russo *et al.*, 2009). Defectos en la síntesis del peptidoglicano se traducen en mayor sensibilidad bacteriana a los antibióticos y a las defensas del hospedador.

Las PBPs de gran masa molecular permiten la polimerización del peptidoglicano y su inserción en la pared celular preexistente. Mientras que las PBPs de baja masa molecular contribuyen a la separación celular y a la remodelación del peptidoglicano (Russo *et al.*, 2009).

Es bien conocida la implicación de PBP-7/8 en la patogénesis de infecciones producidas por *A. baumannii*, actuando como una endopeptidasa, siendo PBP-8 un producto de la degradación de PBP-7, proteína ausente en las bacterias Gram positivas (Russo *et al.*, 2009). PBP-7/8 es una proteína de bajo peso molecular que contribuye al crecimiento y supervivencia de *A. baumannii* en líquido ascítico humano, así como en infecciones de tejido blando y neumonía (Russo *et al.*, 2009). Del mismo modo, participa en la resistencia al suero, probablemente remodelando la superficie celular bacteriana de tal manera que protege al microorganismo de los componentes defensivos del hospedador, como los péptidos antimicrobianos (Jacobs *et al.*, 2010). Además, contribuye tanto directa como indirectamente a la resistencia frente a la actividad bactericida mediada por el complemento.

- Sideróforos

Acinetobacter baumannii es capaz de persistir en un hospedador infectado mediante la adquisición de nutrientes esenciales. El ambiente del hospedador presenta muchas posibilidades nutricionales, así como retos que un patógeno bacteriano debe superar, como la adquisición de hierro, puesto que es un micronutriente celular esencial (Gaddy *et al.*, 2012). La mayoría de hierro en el organismo se encuentra secuestrado por agentes quelantes de alta afinidad (hemoglobina, lactoferrina y transferrina) que evitan sus efectos citotóxicos. Las bacterias expresan una amplia variedad de sistemas de adquisición de hierro de alta afinidad, para captar dicho metal del hospedador. De este modo, las células de *A. baumannii* serían capaces de captar hierro empleando un sideróforo que podría competir con las proteínas de unión de hierro del paciente y superar la falta de dicho metal impuesta por el hospedador (Vallenet *et al.*, 2008).

Algunos autores opinan que el éxito de *A. baumannii* como patógeno tanto de vertebrados como de invertebrados radica en la producción de un sistema de adquisición activa de hierro mediado por acinetobactina (Bergogne-Bérézin y Towner, 1996), lo que permite a la bacteria persistir y causar apoptosis celular, causando finalmente la muerte del hospedador. El sistema de transporte de hierro mediado por acinetobactina no solo se expresa por las bacterias intracelulares, aunque es necesario para la persistencia de las mismas (Gaddy *et al.*, 2012). Por este motivo, se considera la adquisición de hierro mediada por acinetobactina como un factor de virulencia importante en *A. baumannii*. No obstante, la presencia de un “cluster” o grupo de genes codificantes para funciones de adquisición de hierro mediadas por sideróforos adicionales podría indicar que la virulencia de estas cepas es independiente de la expresión del sistema mediado por acinetobactina (Gaddy *et al.*, 2012). Las bacterias que expresan funciones de adquisición de hierro mediadas por acinetobactina causan más daño celular que aquellas que poseen déficit en la biosíntesis o el transporte de dicho sideróforo.

Además, se ha observado que cuando las bacterias de *A. baumannii* crecen bajo condiciones limitantes de hierro se sobreexpresan los grupos de genes de biosíntesis de sideróforos, aunque disminuye la expresión de los genes de movilidad (Perez *et al.*, 2011). Por ello, para poder sobrevivir, regulan la síntesis de sideróforos bajo condiciones de estrés a expensas de otros sistemas celulares.

- **Biofilm**

La formación de biofilm es una estrategia natural que permite la colonización de superficies sólidas (Vidal *et al.*, 1996; Qi *et al.*, 2016). En concreto, el biofilm formado por los patógenos del género *Acinetobacter* se considera un factor importante en el mantenimiento, supervivencia y multiplicación de la bacteria sobre distintas superficies del ambiente hospitalario (Vidal *et al.*, 1996; Kvist *et al.*, 2008; Longo *et al.*, 2014).

Un biofilm es una comunidad bacteriana multicelular que se asocia con una superficie viva o inerte, organizada en una estructura terciaria y encapsulada en una matriz extracelular que favorece su adhesión y cohesión (Lee *et al.*, 2007; Gaddy y Actis, 2009; Espinal *et al.*, 2012; Flemming *et al.*, 2016). Dicha matriz puede estar formada por carbohidratos, ácidos nucleicos, proteínas y otras macromoléculas.

La iniciación y formación de un biofilm bacteriano se basa en una serie de eventos moleculares altamente controlados, que las células mantienen a su vez bajo estricta regulación (Gaddy y Actis, 2009; Qi *et al.*, 2016). Algunos de los factores que regulan la formación de biofilm son la densidad celular (detectada como señales de quorum sensing), superficie sobre la que se desarrollan y disponibilidad de nutrientes o presencia de apéndices bacterianos (Gaddy y Actis, 2009; Bhargava *et al.*, 2010). En los primeros estadios de la formación del biofilm, las células bacterianas individuales se adhieren a la superficie formando microcolonias, dando lugar a la formación posterior de grandes agregados con canales abiertos para el paso de fluidos (Vidal *et al.*, 1996), como se observa en el esquema de la Figura 5 (Schachter, 2003). Las células adheridas se recubren por la matriz de exopolisacárido que actúa como una barrera frente a agentes antibacterianos, células fagocíticas, corrientes hidrodinámicas o la actividad bactericida del suero en condiciones de infección (Vidal *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2007; Kvist *et al.*, 2008; Badave y Dhananjay, 2015; Qi *et al.*, 2016). En lo que a la motilidad de las células se refiere, estudios han visto que dicha capacidad no es estrictamente necesaria para la formación de biofilms, pero sí es un factor importante en el contacto inicial de las células con la superficie, hasta el punto de que las cepas más móviles parecen formar biofilms más robustos que las que carecen de esa habilidad (O'Toole y Kolter, 1998; Tomaras *et al.*, 2003; Peleg *et al.*, 2012; Vijayakumar *et al.*, 2016).

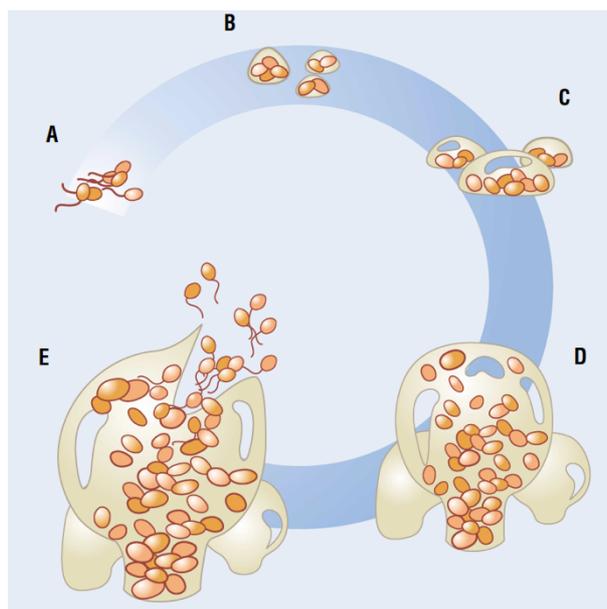


Figura 5: Representación de las fases de formación de biofilm. Fase inicial en la que las bacterias se adhieren a la superficie sólida (A), se agrupan para formar microcolonias (B); maduración y crecimiento de las colonias (C); formación de estructura tridimensional organizada por la matriz (D); liberación de células planctónicas del biofilm maduro (E). (Schachter, 2003).

Acinetobacter baumannii es capaz de formar rápidamente biofilm en superficies inanimadas como el cristal (hidrofílico) o plástico (hidrofóbico), produciendo cantidades elevadas de exopolisacárido (Vidal *et al.*, 1996; Tomaras *et al.*, 2003; Longo *et al.*, 2014). También se ha visto que dicha bacteria tiene capacidad para formar biofilm en la superficie interna de tubos endotraqueales, cuya morfología y extensión varían dependiendo del tipo de tubo (Longo *et al.*, 2014).

En *A. baumannii* se han identificado una serie de determinantes de virulencia relacionados con la formación de biofilm, como puede ser la ya citada membrana externa OmpA, la proteína de membrana externa Bap [biofilm associated protein] (estructura tridimensional), sistema de ensamblaje de pili iniciado por chaperona CsuA/BABCDE (adherencia mediante pili), AbaI sintasa inducible por quorum sensing (sobrexpresada en biofilm sobre células planctónicas), operón *pgaABCD* que produce PNAG (adhesión intercelular), sistema regulador de 2 componentes BfmRS (regulación de expresión operón *csuA/BABCDE*) (Gaddy y Actis, 2009; Longo *et al.*, 2014; Bravo *et al.*, 2016; Subashchandrabose *et al.*, 2016; Vijayakumar *et al.*, 2016; Bardbari *et al.*, 2017). Aunque la investigación de la patogénesis se ha enfocado a la formación de biofilm, no se ha establecido

una clara relación entre dicha estructura y la capacidad de infección, pese a que su presencia parece aumentar la supervivencia del patógeno en el hospedador (Kvist *et al.*, 2008; Rodríguez-Baño *et al.*, 2008; Espinal *et al.*, 2012; Sahl *et al.*, 2013; Longo *et al.*, 2014).

Algunos autores han establecido una correlación positiva entre la formación de biofilm en esta especie y la presencia de multirresistencias (Gaddy y Actis, 2009; Badave y Dhananjay, 2015); por lo que una de las funciones de esta estructura parece ser la protección de las bacterias del estrés externo, lo que incluye la terapia antibiótica. No obstante, hay resultados variables sobre la relación del fenotipo multirresistente y la capacidad de formar biofilms más robustos (Greene *et al.*, 2016; Bardbari *et al.*, 2017); aunque los resultados coinciden en que una vez establecido el biofilm las infecciones son más recalcitrantes a la terapia antibiótica. Además, cabe destacar la relación que se ha establecido entre la sobreexpresión de algunos genes de resistencia (β -lactamasa de amplio espectro *bla_{PER-1}*) y la mayor formación de biofilm por esas cepas (Lee *et al.*, 2007; Gaddy y Actis, 2009; Badave y Dhananjay, 2015).

- Sistema de secreción de tipo VI

El sistema de secreción de tipo VI (T6SS) es una importante herramienta que muchas bacterias Gram negativas emplean para matar a bacterias competidoras (Weber *et al.*, 2015). Dicho sistema se ha encontrado en varias especies de *Acinetobacter*, lo que les permitiría lisar bacterias vecinas y adquirir genes de las mismas (Weber *et al.*, 2015; Cooper *et al.*, 2017). Dichos genes adquiridos horizontalmente del ADN liberado por células lisadas parecen ser estables durante la segregación celular (Cooper *et al.*, 2017). Si bien es cierto que el sistema T6SS está directamente involucrado en la lisis celular, no lo está en la recaptura del ADN liberado tras la muerte activa de las células vecinas. De modo que, la muerte dependiente de contacto por *Acinetobacter* permite aumentar las tasas de transferencia génica horizontal, resaltando el papel de la importancia de las interacciones polimicrobianas en la dispersión genética, como sucede en los biofilms (Cooper *et al.*, 2017).

Weber y colaboradores (2015) proponen en un estudio un fenotipo de *A. baumannii* tipo on/off del sistema T6SS controlado por la presencia o ausencia de un gran plásmido de resistencia que porta el represor de dicho sistema de secreción. De modo que las células que mantienen el plásmido, retienen la capacidad de resistir a los antibióticos pero poseen el sistema de secreción silenciado. Por tanto, este mecanismo aparentemente constituye una estrategia de supervivencia en *A. baumannii*, proporcionando información sobre su

patobiología; puesto que algunas células inactivan el sistema de secreción a favor de la resistencia antibiótica (Weber *et al.*, 2015).

ii. Impacto clínico de *A. baumannii*

Aunque las especies patógenas del género *Acinetobacter* están comúnmente involucradas en infecciones nosocomiales, su impacto clínico también incluye infecciones adquiridas en la comunidad (Cisneros *et al.*, 1996; Dijkshoorn *et al.*, 2007; Perez *et al.*, 2011; McConnell *et al.*, 2013; Lin y Lan; 2014). De hecho, la importancia de esta bacteria ha aumentado, llegando a ser considerado 1 de los 6 patógenos multirresistentes más importantes en todo el mundo (Antunes *et al.*, 2014).

Como patógeno oportunista se ve implicado en diversas infecciones asociadas mayoritariamente a pacientes críticos de las UCIs, como pueden ser la neumonía asociada a ventilación, infecciones de piel, heridas y tejido blando, infecciones del tracto urinario, meningitis secundaria o infecciones sanguíneas (Peleg *et al.*, 2008; Perez *et al.*, 2011). La mayoría de los sistemas orgánicos que se ven afectados por estas infecciones tienen en común la posesión de elevado contenido en fluido (Fournier y Richet, 2006). Pese a que las infecciones adquiridas en el hospital son principalmente atribuidas a *A. baumannii*, otras especies como *A. pittii* y *A. nosocomialis* también suelen estar implicadas (Chusri *et al.*, 2014). Las infecciones nosocomiales causadas por otras especies del género, diferentes a las anteriores, son raras y se ven principalmente restringidas a infecciones sanguíneas relacionadas con catéteres (Howard *et al.*, 2012).

Como patógeno responsable de infecciones adquiridas en la comunidad es poco común pero está adquiriendo importancia como causa importante de neumonía, que suele tener un curso clínico fulminante (Perez *et al.*, 2011). Otro tipo de manifestaciones clínicas asociadas a *A. baumannii* en ambiente no hospitalario son raras, del mismo modo que los organismos multirresistentes en dicho ámbito (Howard *et al.*, 2012).

Como caso particular, es bastante frecuente la manifestación nosocomial de *A. baumannii* en infecciones de heridas asociadas a desastres naturales o desastres causados por el hombre (enfrentamientos bélicos) (Perez *et al.*, 2011; Howard *et al.*, 2012;). En estas ocasiones, se ha concluido que las infecciones son principalmente debidas a la contaminación del ambiente de los hospitales de campaña y a la transmisión de la infección en las instalaciones sanitarias (Howard *et al.*, 2012).

Pese a que existe mucha variabilidad entre estudios y afecciones, la tasa de mortalidad media para estas infecciones se ha establecido entre 19 y 54% (Russo *et al.*, 2010). No obstante, al establecer diferencias en la mortalidad en hospitales a nivel general frente a la mortalidad en UCIs, las tasas varían entre 7,8-22% y 10-43%, respectivamente (Lin y Lan, 2014). Las diferencias en la mortalidad podrían atribuirse a la expresión diferencial tanto de factores de virulencia como de determinantes específicos. A continuación se desglosan las principales patologías asociadas a infecciones causadas por el patógeno *A. baumannii*, y se recogen los principales órganos afectados por ello en la siguiente figura (Figura 6).

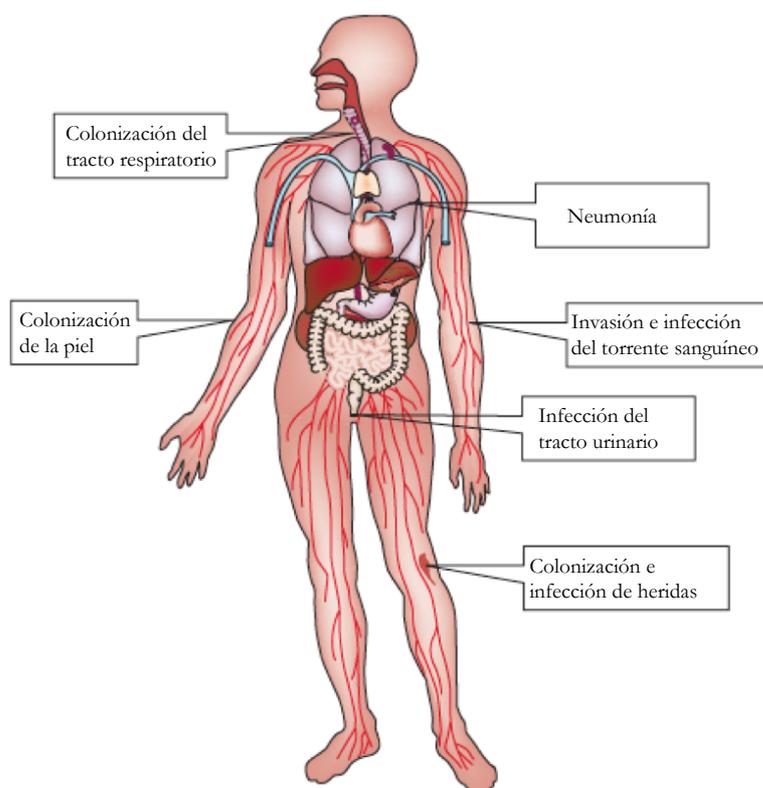


Figura 6: Principales órganos y/o tejidos afectados por el patógeno *A. baumannii*. Adaptado de Dijkshoorn *et al.*, 2007.

- Neumonía adquirida en el hospital

Esta patología es la manifestación clínica más común de las infecciones debidas a *A. baumannii*, puesto que la mayoría de los aislados de esta especie tienen su origen en el tracto respiratorio de pacientes hospitalizados (Peleg *et al.*, 2008). Se ve con más frecuencia en pacientes de cuidados intensivos con ventilación mecánica, motivo por el cual, se cree que este tipo de infecciones respiratorias son el resultado de la colonización (Bergogne-Bérézin y Towner, 1996; Russo *et al.*, 2010; Howard *et al.*, 2012). En España, *A. baumannii* es la tercera

causa de neumonía, por detrás de las causadas por *P. aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, o la segunda como consecuencia de infección por bacterias Gram negativas (Cisneros-Herreros *et al.*, 2005; Luna y Aruj, 2007). Los porcentajes relacionados con esta patología oscilan entre 3-5% en unos estudios y 15-24% en otros, variación principalmente asociada al uso de mecanismos de ventilación y su correcta desinfección.

- **Neumonía adquirida en la comunidad**

Pese a ser un patógeno principalmente nosocomial, se han encontrado casos de pacientes con neumonía por este microorganismo fuera del ambiente hospitalario (Perez *et al.*, 2011). En los individuos afectados, la fuente de la infección suele ser debida al transporte del patógeno en la garganta, lo que ocurre en más del 10% de la población que consume alcohol en exceso, en ocasiones asociado a estaciones más lluviosas (Peleg *et al.*, 2008). Además, este tipo de patología suele ir asociada a condiciones subyacentes, como pueden ser el ya citado alcoholismo, el hábito de tabaquismo, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o la diabetes mellitus. Se manifiesta de manera severa y repentina, y suele ir seguido de infección sanguínea secundaria, con unos ratios de mortalidad entre el 40 y el 70% (Cisneros-Herreros *et al.*, 2005; Howard *et al.*, 2012).

- **Infecciones del torrente sanguíneo**

La bacteriemia es una manifestación frecuente en las infecciones por *A. baumannii* (Cisneros *et al.*, 1996). Se calcula que cerca del 1,3% de todas las infecciones sanguíneas monomicrobianas son causadas por *Acinetobacter* (Peleg *et al.*, 2008; Russo *et al.*, 2010), aunque también es frecuente encontrar co-infecciones en esta patología (Bergogne-Bérézin y Towner 1996; Cisneros *et al.*, 1996). Del mismo modo que en el caso de las patologías pulmonares, son infecciones mucho más frecuentes las adquiridas en la UCI que fuera de ella, cuyas tasas de mortalidad asociadas también varían significativamente (Cisneros *et al.*, 1996). De hecho, se considera que solo las infecciones del torrente sanguíneo adquiridas en la UCI debidas a *P. aeruginosa* y *Candida* spp. superan en tasa de mortalidad a las causadas por *Acinetobacter* (Howard *et al.*, 2012). Las infecciones por *A. baumannii* del torrente sanguíneo son, además, las más tardías tras el momento de hospitalización (Peleg *et al.*, 2008). La bacteriemia causada por este patógeno como infección adquirida en la comunidad es muy poco común, y suele asociarse como una respuesta secundaria a neumonías severas adquiridas en la comunidad (Cisneros *et al.*, 1996). Los ratios de mortalidad para esta patología son altos y muy variables (entre 24 y 50%).

- **Traumas y heridas**

En casos de infecciones en la piel, resulta particularmente complicado diferenciar entre infección y colonización. Es relativamente común encontrar a este microorganismo en las unidades de quemados, donde actúa como un importante patógeno oportunista, resultando difícil de tratar en pacientes que poseen quemaduras severas. No obstante, es poco frecuente encontrar infecciones epiteliales o de tejido blando causadas por *A. baumannii* fuera de focos militarizados (Perez *et al.*, 2011). De hecho, recientemente se ha visto que este patógeno es la principal causa de preocupación asociado a infecciones secundarias a heridas en zonas de conflicto, como Iraq y Afganistán; o incluso en áreas azotadas por desastres naturales como terremotos (Howard *et al.*, 2012; Antunes *et al.*, 2014). Estas infecciones suelen presentar una clínica similar con una celulitis característica de apariencia de “piel de naranja”, e infección severa resultante en formación de vesículas en la superficie de la piel (Howard *et al.*, 2012).

- **Meningitis**

La meningitis nosocomial post-neuroquirúrgica causada por *A. baumannii* se está volviendo cada vez más común, junto con las de otras bacterias Gram negativas que resultan problemáticas en los cuidados post-operatorios, debido a que los drenajes ventriculares externos se convierten en sitios para infecciones oportunistas (Howard *et al.*, 2012). La meningitis causada por bacilos Gram negativos rara vez ocurre de manera espontánea (meningitis primaria), sino que se ve casi siempre asociada en adultos a una cirugía neurocirugía (punción lumbar, mielografía, ventriculografía) o a un importante traumatismo craneal (meningitis secundaria) (Bergogne-Bérézin y Towner, 1996; Briggs *et al.*, 2004). Aunque la tasa de mortalidad puede superar el 70%, resulta imposible discernir la causa real del fatal desenlace (Howard *et al.*, 2012).

- **Infecciones del tracto urinario**

Ocasionalmente, *A. baumannii* es responsable de infecciones del tracto urinario (ITU), atribuyéndose en torno al 1,6% de estas infecciones adquiridas en las UCIs (Peleg *et al.*, 2008). Debido a su asociación con dispositivos médicos, se relaciona con infecciones o colonizaciones asociadas a los catéteres.

- **Osteomielitis**

La osteomielitis causada por *A. baumannii* se da principalmente en personal militar que ha sufrido trauma relacionado con guerras (Luke *et al.*, 2010; McConnell *et al.*, 2013), aunque no se han encontrado casos de enfermedad adquiridos en la sociedad. La mayoría de estos casos requieren intervención quirúrgica del hueso necrótico, asociándose en ciertas ocasiones con una progresión a bacteriemia (McConnell *et al.*, 2013). Algunos estudios en modelo animal han mostrado formación osteoblástica en el hueso en la zona de infección, frente a otros patógenos como *S. aureus* que inducen una respuesta osteolítica (McConnell *et al.*, 2013). La tasa de mortalidad para esta patología se fija en 0 debido al escaso número de casos.

- **Endocarditis**

El patógeno *A. baumannii* puede también ser una causa infrecuente de endocarditis, un proceso inflamatorio del revestimiento interno de cámaras y válvulas cardiacas (Peleg *et al.*, 2008; McConnell *et al.*, 2013; Touchon *et al.*, 2014). Esta patología se ha asociado individualmente con válvulas prostéticas y catéteres intravasculares, así como procedimientos dentales y cirugías a corazón abierto (Bergogne-Bérézin y Towner, 1996).

- **Peritonitis**

Pacientes sometidos a una continua diálisis peritoneal ambulatoria pueden desarrollar peritonitis causada por *A. baumannii*, aunque resulta complicado discernir cuáles de esos episodios son nosocomiales (Bergogne-Bérézin y Towner, 1996).

c. Mecanismos de resistencia a los antibióticos

Los compuestos antimicrobianos han curado y tratado muchos casos de infecciones serias, así como aliviado la agonía de muchos pacientes desde su descubrimiento. Sin embargo, el uso masivo de antibacterianos durante las últimas 5 décadas ha sometido a las cepas sensibles a una gran presión selectiva, lo que ha dado lugar a cepas resistentes a más de un antibiótico (Khan y Khan, 2016). Pese al hecho de que la dispersión de bacterias resistentes representa una amenaza a la morbilidad y la mortalidad globales, la investigación y el desarrollo farmacéutico no han podido cumplir con la necesidad clínica de nuevos antibióticos. Por ello, estados miembros de la OMS solicitaron la creación de una lista de prioridad para aquellas bacterias para las que resultaba más urgente la necesidad de nuevos

antibióticos, con el fin de priorizar la financiación y facilitar la coordinación global de estrategias de investigación y desarrollo. En dicha lista, *A. baumannii* resistente a carbapenémicos ocupa el primer lugar, como se ha mencionado anteriormente (Tacconelli *et al.*, 2017; WHO, 2017).

Como ya se ha introducido, *Acinetobacter* es un género bacteriano caracterizado por su elevada capacidad o propensión a desarrollar resistencias a la mayoría de antimicrobianos usados en la clínica común, lo que podría ser consecuencia de su exposición evolutiva a organismos productores de antibióticos en el suelo. Pese a que la capacidad de adquirir resistencias está descrito en muchas bacterias, existe un contraste entre este género y patógenos más frecuentes o habituales, ya que estos últimos parecen necesitar más tiempo para adquirir mecanismos de resistencia altamente efectivos en respuesta a la introducción de estrategias terapéuticas modernas, mientras que *Acinetobacter* se caracteriza por una adquisición muy rápida de los mismos (Bergogne-Bérézin y Towner, 1996). Cabe destacar que, análisis filogenéticos y de similitud de secuencias han confirmado que la mayoría de los genes de resistencia encontrados en la cepa de referencia de *A. baumannii* AYE han sido adquiridos de manera reciente desde los géneros *Pseudomonas*, *Salmonella* y/o *Escherichia* (Peleg *et al.*, 2008).

Además de dicha capacidad de adquisición, este organismo suele ser intrínsecamente resistente a muchos antibióticos de rutina (Dijkshoorn *et al.*, 2007). Dicho fenotipo de resistencia intrínseca se atribuyó durante mucho tiempo a la baja permeabilidad de sus membranas, si bien se ha visto que los mecanismos de expulsión contribuyen de una manera más significativa a dicha característica (Li *et al.*, 1994). Además, la resistencia inherente a una amplia gama de antibióticos parece ser el resultado de la relación entre la baja permeabilidad (menor contenido de porinas que otros organismos Gram negativos) y los sistemas de expulsión constitutiva (Wong *et al.*, 2017). Algunos autores, de hecho, han acuñado el término “capitalismo genético” para referirse al potencial adaptativo de estos organismos para enriquecer sus mecanismos de resistencia, bien sea a través de eventos de adquisición génica o mediante mutaciones (Khan y Khan, 2016).

La definición de cepas multirresistentes varía cuando se refiere a un amplio grupo de genotipos y fenotipos, por lo que diferentes términos se han usado con variedad de definiciones para describir el grado de resistencia antimicrobiana. En el caso del género *Acinetobacter*, teniendo en cuenta los diferentes mecanismos de resistencia conocidos y los

antimicrobianos usados para tratar sus infecciones, tales definiciones son (Manchanda *et al.*, 2010; Magiorakos *et al.*, 2012):

- *Acinetobacter* spp. MDR (multirresistente, de las siglas en inglés de **multi**drug-resistant): un aislado resistente al menos a un compuesto de 3 clases de antimicrobianos, normalmente todas las penicilinas y cefalosporinas, las fluoroquinolonas y los aminoglucósidos.
- *Acinetobacter* spp. XDR (extremadamente resistente, de las siglas en inglés de **extensively** drug-resistant): un aislado resistente a más de un compuesto en todas las clases de antimicrobianos salvo en 2, normalmente un aislado MDR que además sea resistente a carbapenémicos.
- *Acinetobacter* spp. PDR (pan-resistente, de las siglas en inglés de **pan**drug-resistant): un aislado resistente a los distintos compuestos definidos para este grupo de todas las clases de antimicrobianos, normalmente un aislado XDR que además sea resistente a polimixinas y tigeciclina.

Los aislados MDR de *A. baumannii* han aumentado en los últimos años, limitando de este modo las opciones terapéuticas y el rendimiento de los antibióticos frente a sus infecciones (Van Looveren *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2014). Cabe destacar que, hasta la fecha, *A. baumannii* se ha convertido en resistente a la mayoría de agentes antimicrobianos que están disponibles (Fournier y Richet, 2006; Hung *et al.*, 2012; Hou y Yang, 2015; Lean y Yeo, 2017). De hecho, ya se han hallado cepas con fenotipo PDR en distintos lugares y con orígenes de las muestras muy diversos, tanto clínicos como ambientales (Valencia *et al.*, 2009; Goic-Barisic *et al.*, 2016; Lean y Yeo, 2017).

Un paso intermedio que se ha descrito también en esta especie es la heterorresistencia, considerada un estadio precursor a la resistencia como estrategia de la evolución natural (Cai *et al.*, 2012; Hung *et al.*, 2012). La heterorresistencia se define como la aparición de resistencia antimicrobiana en diferentes subpoblaciones del mismo aislado genéticamente homogéneo, que exhiben un fenotipo resistente debido a la presencia de poblaciones mezcladas.

De modo que, más que a sus características o factores de virulencia, el principal peligro asociado con *A. baumannii* reside en su capacidad de adquirir determinantes de resistencias de manera muy rápida, llevando a las cepas a un fenotipo de multirresistencia (Fournier y Richet, 2006; Wong *et al.*, 2017). No obstante, los ratios de resistencia pueden

variar en función del país y/o el hospital, ya que dependen de factores biológicos, epidemiológicos o metodológicos (Van Looveren *et al.*, 2004; Dijkshoorn *et al.*, 2007). Por ejemplo, la valoración de sensibilidad local sin la corrección de las cepas epidémicas multirresistentes predominantes tiende a sobreestimar el nivel de resistencias.

Los mecanismos de resistencia descritos para *A. baumannii* son la mayoría de los conocidos para otras bacterias, véase enzimas degradantes de antibióticos, cambios genéticos que producen alteraciones en la membrana, sobreexpresión de bombas de expulsión, modificación en las dianas de los fármacos, sobreexpresión de enzimas modificadoras de antimicrobianos y adquisición de nuevos determinantes de resistencia. La coexistencia en la misma célula de varios mecanismos distintos produce mayores niveles de resistencia; de hecho, aislados con fenotipo MDR o superior, suelen poseer varios mecanismos que confieren resistencia a antibióticos de la misma clase, actuando de manera sinérgica (Gordon y Wareham, 2010). A continuación, se detallan los principales mecanismos de resistencia conocidos por los que patógenos de este género exhiben resistencias a las principales clases de antimicrobianos.

i. Mecanismos enzimáticos

Los mecanismos enzimáticos que confieren resistencia a antimicrobianos son la presencia o sobreexpresión de enzimas degradantes (hidrolíticas) de antibióticos, siendo esta una de las principales estrategias de resistencia que poseen estas bacterias frente a antibióticos β -lactámicos; y enzimas modificadoras del sustrato, siendo en este caso el mecanismo principal de resistencia a aminoglucósidos.

o Resistencia a β -lactámicos

Los antibióticos β -lactámicos actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular, mediante la modificación de PBPs, lo que causa un debilitamiento del peptidoglucano llevando a la muerte celular por desajuste osmótico. Dentro de este grupo, los carbapenémicos son los que poseen mayor espectro de actividad.

Las especies de *Acinetobacter* poseen un amplio rango de β -lactamasas que hidrolizan y confieren resistencia a penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos, constituyendo esta inactivación una importante parte de la multirresistencia en *A. baumannii*. El primer brote causado por *A. baumannii* resistente a carbapenémicos se reportó en 1991 en América, pasando a ser endémicos en 1997, seguido de la diseminación global del patógeno (Evans *et*

al., 2008; Lin y Lan, 2014). En un estudio reciente se estableció la resistencia a estos compuestos en cepas de *A. baumannii* aisladas en centros médicos de EEUU en un 33% (Nowak y Paluchowska, 2016).

En esta especie se han identificado las 4 clases de enzimas descritas por Ambler (A, B, C y D) en base a su homología de aminoácidos (Ambler, 1980), siendo las clases A, B y D las que poseen un impacto epidemiológicamente mayor (Bialvaei *et al.*, 2015).

Las enzimas de **clase A** o β -lactamasas de espectro extendido (ESBLs) poseen un bajo número de representantes con actividad carbapenemasa, siendo los principales ejemplos las enzimas TEM, SHX, CTX-M, KPC y GES (Sirijan y Nitaya, 2006; Nowak y Paluchowska, 2016; Wong *et al.*, 2017). Las enzimas TEM y SHV presentan elevados ratios de mutación, que dan lugar a un alto nivel de diversidad, si bien son más frecuentes en otras especies de enterobacterias (Sirijan y Nitaya, 2006). Del mismo modo, cabe destacar la actividad de 2 enzimas codificadas por plásmidos, aunque es poco frecuente detectarlas en *Acinetobacter*: KPC con actividad frente a β -lactámicos y principalmente detectada en aislados de enterobacterias; y GES, β -lactamasas adquiridas descritas en los mismos grupos bacterianos que la anterior pero con mayor restricción geográfica (Bialvaei *et al.*, 2015; Nowak y Paluchowska, 2016; Wong *et al.*, 2017).

Las enzimas de **clase B** o metalo- β -lactamasas (MBLs) proporcionan resistencia a un amplio espectro de β -lactámicos, sino a todos, incluyendo penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos. Los genes codificantes para MBLs normalmente se localizan en casetes génicos en integrones, formando parte tanto de plásmidos como de cromosomas. Si bien no son tan prevalentes como otros grupos en *A. baumannii*, exhiben una actividad hidrolítica significativamente mayor que las otras clases frente a carbapenémicos. Todas las MBLs descritas han sido encontradas en *Acinetobacter*: IMP, VIM, NDM y SIM (Sirijan y Nitaya, 2006; Peleg *et al.*, 2008; Bialvaei *et al.*, 2015; Nowak y Paluchowska, 2016; Wong *et al.*, 2017): IMP se caracteriza por poseer una amplia especificidad de sustrato; VIM está considerada la MBL más prevalente en todo el mundo pero con pocos alotipos descritos en *A. baumannii*; NDM es la carbapenemasa más recientemente descubierta, y aunque los 2 grupos anteriores son los principales, este grupo emergente se está convirtiendo por ello en la enzima más amenazante; SIM es el grupo que presenta menor prevalencia y parece tener una limitación geográfica muy restringida.

Las enzimas de **clase C** o cefalosporinas derivadas de *Acinetobacter* (ADCs) son enzimas intrínsecas (*ampC*), cromosómicamente codificadas, de *A. baumannii*, que proporcionan un bajo nivel de resistencia a un estrecho espectro de cefalosporinas (Van Looveren *et al.*, 2004; Sirijan y Nitaya, 2006). Análisis filogenéticos de genes *ampC* de *Acinetobacter* mostraron que descienden de un ancestro común, y que están estrechamente relacionados con los genes *ampC* encontrados en otras especies (Lin y Lan, 2014). A diferencia de lo que sucede en otros patógenos Gram negativos, su expresión no es inducible, sino que el determinante clave en la regulación de la sobreexpresión de esta enzima es la presencia de la secuencia de inserción IS*Aba1* aguas arriba del gen (Dijkshoorn *et al.*, 2007; Peleg *et al.*, 2008; Gordon y Wareham, 2010).

Las enzimas de **clase D** u oxacilinasas (OXAs) son el grupo más numeroso, con más de 400 representantes, de los cuales cerca de la mitad presentan actividad carbapenemasa, actividad detectada por primera vez en 1985 en Escocia (Van Looveren *et al.*, 2004; Dijkshoorn *et al.*, 2007; Evans *et al.*, 2008; Gordon y Wareham, 2010; Nowak y Paluchowska, 2016). Se han descrito 6 clúster en *A. baumannii* que poseen estructura general compartida, dentro de los cuáles existe un gran número de variedades alélicas. Los distintos grupos de OXAs, explicados a continuación, poseen distinta afinidad por los diferentes sustratos antibióticos:

- OXA-tipo-51: componen el mayor grupo en esta especie, siendo innatas y cromosómicas (detectadas por primera vez en 2004), por lo que su secuencia se emplea en la detección de *A. baumannii*. Estas enzimas poseen baja eficiencia catalítica debido a la baja afinidad de la enzima por el antibiótico; aunque la sobreproducción mediada por la secuencia de inserción IS*Aba1* puede desencadenar en resistencia a carbapenémicos (Dijkshoorn *et al.*, 2007; Evans *et al.*, 2008; Gordon y Wareham, 2010; Evans y Amyes, 2014; Nowak y Paluchowska, 2016).
- OXA-tipo-23: fue la primera OXA adquirida identificada en 1985 (Van Looveren *et al.*, 2004; Evans *et al.*, 2008; Evans y Amyes, 2014). En este caso, los genes que las codifican pueden encontrarse tanto en plásmido como en el cromosoma. De nuevo, su expresión puede verse incrementada por la presencia de IS*Aba1* aguas arriba del gen, aunque la presencia del mismo es suficiente para conferir resistencia. Los aislados que poseen esta enzima, presentan un alto nivel de resistencia cuando coexisten con otros mecanismos, como bombas de expulsión (AdeABC) (Van Looveren *et al.*, 2004; Evans y Amyes, 2014; Nowak y Paluchowska, 2016).

- OXA-tipo-40/24: grupo de carbapenemasas adquiridas, con menos de 10 variedades distintas, siendo el segundo grupo en ser descubierto en esta especie en el año 1997 en España. Son capaces de hidrolizar penicilinas y exhibir actividad débil contra cefalosporinas y carbapenémicos (Evans y Amyes, 2014; Nowak y Paluchowska, 2016).
- OXA-tipo-58: hidrolizan carbapenémicos a bajo nivel, aunque su expresión puede aumentar en presencia de secuencias de inserción. De nuevo, pueden hallarse en plásmidos y/o cromosomas y fueron detectados por primera vez en Francia en el año 2003 (Evans y Amyes, 2014; Nowak y Paluchowska, 2016).
- OXA-tipo-143: enzimas con bajos ratios de hidrólisis, y que no parece estar asociada a secuencias de inserción ni integrones, que se encuentran localizadas únicamente en plásmidos (Evans y Amyes, 2014; Nowak y Paluchowska, 2016).
- OXA-tipo-48: recientemente detectadas por primera vez en *A. baumannii*, ya que son más comunes en *K. pneumoniae* (identificada por primera vez en 2001) y enterobacterias, siendo también la más preocupante por su rápido desarrollo (Evans y Amyes, 2014; Bialvaei *et al.*, 2015; Nowak y Paluchowska, 2016).

De modo que, el mecanismo más relevante de la resistencia a carbapenémicos en *A. baumannii* está asociado con las enzimas que hidrolizan los β -lactámicos, representadas por carbapenemasas MBL y enzimas tipo OXA. Estas trabajan de manera conjunta con otros mecanismos de resistencia, que se exponen en el siguiente apartado, para conseguir un fenotipo de elevado nivel de resistencia (Sirijan y Nitaya, 2006; Peleg *et al.*, 2008; Nowak y Paluchowska, 2016).

○ **Resistencia a aminoglucósidos**

Los aminoglucósidos son compuestos ampliamente usados en el tratamiento de infecciones por *Acinetobacter*, que actúan inhibiendo la síntesis proteica a través de la unión con la subunidad 30S del ribosoma. Aunque un creciente número de cepas altamente resistentes se han hallado desde los años 70, en general siguen manteniendo actividad pero suelen usarse de manera combinada con otros fármacos (Bergogne-Bérézin y Towner, 1996; Van Looveren *et al.*, 2004; Dijkshoorn *et al.*, 2007).

La resistencia a dichos compuestos en estos patógenos, como en otros organismos Gram negativos, viene dado por enzimas modificadoras de aminoglucósidos (EMAs), habiéndose descrito en cepas clínicas de *A. baumannii* genes codificantes para las tres clases, acetiltransferasas, nucleotidiltransferasas y fosfotransferasas (Bergogne-Bérézin y Towner, 1996; Dijkshoorn *et al.*, 2007; Peleg *et al.*, 2008; Gordon y Wareham, 2010; Lin y Lan, 2014; Lean *et al.*, 2016). La presencia de estas enzimas en integrones es muy prevalente en cepas de *A. baumannii* MDR, pudiendo encontrarse en diferentes combinaciones (Peleg *et al.*, 2008). Si bien se han identificado las 3 clases de EMAs en cepas clínicas de *A. baumannii*, se han encontrado variaciones geográficas en la incidencia de genes particulares (Bergogne-Bérézin y Towner, 1996). La expresión de estos genes lleva a una sensibilidad variable frente a diferentes tipos de aminoglucósidos.

También se han descrito en *A. baumannii* otro tipo de enzimas que confieren alto nivel de resistencia a todos los aminoglucósidos usados en la clínica común, las metiltransferasas de ARN ribosómico (ARNr) 16S (gen *armA*) (Van Looveren *et al.*, 2004; Peleg *et al.*, 2008; Gordon y Wareham, 2010; Lin y Lan, 2014; Lean *et al.*, 2016).

ii. Mecanismos no enzimáticos

La resistencia enzimática puede verse aumentada por otro tipo de mecanismos no enzimáticos, como la modificación de los sitios diana de los antibióticos, la presencia o sobreexpresión de bombas de expulsión y cambios en la permeabilidad de la membrana debidos a la pérdida de proteínas de membrana externa, entre otros.

- Modificación de dianas

La resistencia a algunos antibióticos ocurre a través de mecanismos que alteran los sitios diana de los diferentes compuestos, como en el caso de quinolonas, tetraciclinas y polimixinas.

o Resistencia a quinolonas y fluoroquinolonas

Las quinolonas son un conjunto de compuestos bactericidas que actúan a través de la inhibición en la síntesis de ácidos nucleicos, siendo el grupo más usado en clínica el de las fluoroquinolonas que inhiben concretamente la actividad de la enzima ADN girasa. Si bien estos compuestos han permanecido activos frente a cepas de *A. baumannii*, la resistencia se está distribuyendo entre cepas epidémicas de esta especie, causando una disminución

importante en la utilidad de estos fármacos (Van Looveren *et al.*, 2004; Dijkshoorn *et al.*, 2007).

Debido a su mecanismo de acción, las principales estrategias descritas para la resistencia a esta familia de antibióticos son las mutaciones puntuales en los genes que codifican para las proteínas diana de estos fármacos; es decir, sobre *gyrA* que causa cambios en la subunidad de la ADN girasa y sobre *parC* en la topoisomerasa IV (Bergogne-Bérézin y Towner, 1996; Van Looveren *et al.*, 2004; Dijkshoorn *et al.*, 2007; Peleg *et al.*, 2008; Gordon y Wareham, 2010; Lin y Lan, 2014; Lean *et al.*, 2016).

○ **Resistencia a tetraciclinas y gliciliclinas**

Las tetraciclinas, al igual que los aminoglucósidos, inhiben la síntesis proteica, en este caso mediante su unión con la subunidad 50S del ribosoma bacteriano. Aunque el principal mecanismo de resistencia a estos compuestos son las bombas de expulsión específicas, en *A. baumannii* está descrita la presencia de genes que codifican proteínas de protección ribosomal, impidiendo el acceso de los mismos, como es el caso de la proteína TetM que confiere resistencia a tetraciclina pero no a minociclina (Van Looveren *et al.*, 2004; Peleg *et al.*, 2008; Gordon y Wareham, 2010; Lin y Lan, 2014).

○ **Resistencia a polimixinas**

Las polimixinas (polimixina B y polimixina E o colistina) son péptidos con actividad antibiótica que actúan uniéndose al LPS, causando un efecto tipo detergente que interrumpe la membrana externa. Se consideran antibióticos de último recurso, representando la última opción terapéutica en algunos casos para tratar infecciones causadas por *Acinetobacter* MDR, si bien ya se han encontrado aislados resistentes a estos compuestos (Cai *et al.*, 2012). La resistencia a polimixinas ocurre casi exclusivamente en pacientes que han recibido tratamiento con colistina en infecciones con *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos pero sensibles al péptido inicialmente (Goic-Barisic *et al.*, 2016; Karaiskos *et al.*, 2017).

El mecanismo de resistencia a polimixinas en *A. baumannii* se ha descubierto recientemente, y se cree que es debido a modificaciones covalentes en la posición del lípido A en el LPS o en la disrupción de la biosíntesis del mismo. La sobreexpresión del gen *pmrC*, que codifica para una enzima intermediaria en la síntesis del lípido A, se ha relacionado con la resistencia ya que perjudica la unión de la polimixina a la membrana externa (Boll *et al.*, 2015; Lean *et al.*, 2016; Nhu *et al.*, 2016; Karaiskos *et al.*, 2017). Del mismo modo que la

sobreexpresión y/o mutación en los genes del regulador de dos componentes *pmrAB* (principalmente *pmrB*), que forman parte del mismo operón (Gordon y Wareham, 2010; Lean *et al.*, 2016; Karaiskos *et al.*, 2017). También se ha descrito la pérdida completa del LPS en algunas cepas resistentes a estos fármacos, causada por mutaciones o inactivación de los genes de biosíntesis del lípido A, que resulta en una disminución en la integridad de la membrana externa (Cai *et al.*, 2012; Lin y Lan, 2014; Lean *et al.*, 2016; Nhu *et al.*, 2016; Karaiskos *et al.*, 2017).

De modo que la resistencia a polimixina podría ser el resultado de la combinación en la sobreexpresión de algún componente del operón *pmrABC* y el deterioro o pérdida en la síntesis de LPS por mutaciones en los genes que codifican las enzimas de la ruta de biosíntesis del lípido A (Lean *et al.*, 2016).

- Resistencia a otros antimicrobianos

Se ha descrito un alto nivel de resistencia de aislados clínicos de *A. baumannii* a otros antibióticos, como macrólidos, cloranfenicol y sulfonamidas (trimetoprim).

La resistencia a antibióticos macrólidos, que actúan al igual que los aminoglucósidos inhibiendo la síntesis proteica mediante unión a la subunidad 30S, se ha relacionado con la presencia de genes codificantes de fosfotransferasas (*mph2*), y de bombas de expulsión específicas, como la codificada por el gen *mel* (Lean *et al.*, 2016). Dichos antibióticos son, a su vez, sustrato de otras bombas no específicas, como la bomba AdeM que es capaz de expulsar eritromicina o la bomba AbeS (Gordon y Wareham, 2010).

El cloranfenicol es un compuesto bacteriostático con un mecanismo de acción similar a la tetraciclina, inhibe la síntesis proteica a nivel de la subunidad ribosómica 50S. La resistencia a cloranfenicol suele estar asociada con la síntesis de la enzima cloranfenicol acetiltransferasa (*cat*), detectada tanto en plásmidos como en cromosoma, lo que sugiere una posible codificación mediada por transposón (Bergogne-Bérézin y Towner, 1996; Van Looveren *et al.*, 2004). Para este compuesto también se han hallado bombas de expulsión específicas, como los sistema de expulsión CmlA o CraA, que son bombas que pertenecen a la superfamilia MFS; siendo además sustrato de otras bombas ya mencionadas como AdeM y AbeS (Gordon y Wareham, 2010; Lin y Lan, 2014).

Las sulfonamidas y el trimetoprim son compuestos bactericidas que actúan inhibiendo la síntesis de ácido fólico bacteriano en distintos puntos de la ruta. Por ello, la

resistencia a sulfonamidas y trimetoprim normalmente es debida a la adquisición de plásmidos que portan genes que codifican versiones de las proteínas dianas, como los genes *sul* y *folA*, respectivamente; o genes en integrones como *dhfr* y *dfr* (Bergogne-Bérézin y Towner, 1996; Van Looveren *et al.*, 2004; Peleg *et al.*, 2008; Gordon y Wareham, 2010; Lin y Lan, 2014); siendo el trimetoprim también sustrato de bombas de expulsión como el sistema AbeS (Gordon y Wareham, 2010).

- **Bombas de expulsión**

Como ya se ha mencionado, las bacterias no solo resisten la acción de antibióticos mediante modificación o inactivación enzimática, sino que disponen de otros mecanismos como evitar su entrada y/o la expulsión activa de dichos compuestos, hecho al que se le ha atribuido cada vez más importancia en la multirresistencia (Li *et al.*, 1994; Poole, 2004; Piddock, 2006a; Sirijan y Nitaya, 2006; Blair *et al.*, 2014; Du *et al.*, 2018). La sobreexpresión de estos sistemas de expulsión es la responsable de la reducción en la acumulación del antibiótico, causando así la resistencia a los fármacos y a otros compuestos, incluyendo moléculas del hospedador (Piddock, 2006a; Piddock, 2006b; Blair y Piddock, 2009; Gordon y Wareham, 2010; Coyne *et al.*, 2011).

Las bombas de expulsión activa se clasifican en base al número de componentes que poseen, al número de regiones transmembrana, a la fuente de energía y al tipo o rango de sustratos que poseen las mismas (Piddock, 2006a; Piddock 2006b; Blair *et al.*, 2014; Hernando-Amado *et al.*, 2016; Du *et al.*, 2018). De este modo se diferencian 5 familias tradicionales representadas en la Figura 7 (*ABC* [**A**TP-**b**inding **c**assette], *MATE* [**m**ultidrug **a**nd **t**oxic **e**xtrusion], *MFS* [**m**ajor **f**acilitator **s**uperfamily], *RND* [**r**esistance-**n**odulation-**c**ell **d**ivision] y *SMR* [**s**mall **m**ultidrug **r**esistance]) (Piddock, 2006a; Piddock 2006b; Blair *et al.*, 2014; Hernando-Amado *et al.*, 2016), aunque recientemente se ha considerado la existencia de una nueva familia al identificar algún miembro de la misma en *Acinetobacter* (*PACE* [**p**roteobacterial **a**ntimicrobial **c**ompound **e**fflux]) (Du *et al.*, 2018).

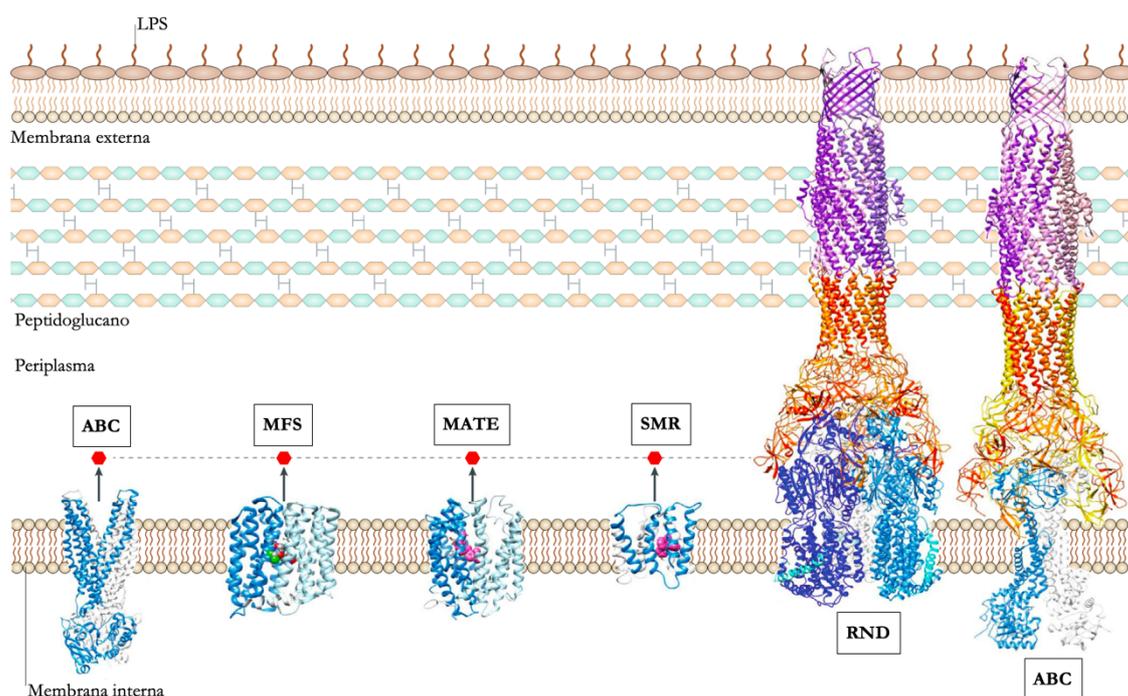


Figura 7: Representación esquemática de las principales familias de bombas de expulsión de bacterias Gram negativas. Adaptado de Du *et al.*, 2018.

Las bombas que poseen un amplio rango de sustratos son las que confieren mayor resistencia a antibióticos clínicamente relevantes, puesto que son capaces de expulsar sustancias químicamente no relacionadas (Poole, 2005; Piddock, 2006a; Piddock, 2006b). Los genes que codifican para estas proteínas pueden encontrarse en el cromosoma, participando por ende en la resistencia intrínseca, o en elementos móviles; siendo de manera genérica las cromosómicamente codificadas las que poseen un rango de sustratos más amplio (Piddock, 2006a; Piddock, 2006b; Hernando-Amado *et al.*, 2016). Se considera, por ello, que la resistencia que proporcionan puede ser a 3 niveles: intrínseca, adquirida o fisiológica (aumento de expresión transitorio no heredable) (Hernando-Amado *et al.*, 2016). Estas bombas que proporcionan distintas vías de expulsión, pueden actuar de manera cooperativa o redundante, confiriendo diferentes perfiles de resistencia a los aislados que las poseen y expresan (Piddock, 2006a; Du *et al.*, 2018).

En base a la fuente de energía se consideran primarios o secundarios, si usan la hidrólisis del ATP o el potencial electroquímico de la membrana, respectivamente. No obstante, en su papel en la resistencia tiene mayor importancia la organización basada en el número de componentes que forman su estructura. A continuación, se explican las características y ejemplos principales dentro de cada una de las familias.

Familia RND. En términos de resistencia, es la familia de bombas más relevantes en patógenos Gram negativos, por lo que también lo son para *A. baumannii*, ya que expulsan un amplio rango de sustratos estructuralmente no relacionados (Poole, 2004; Sirijan y Nitaya, 2006; Gordon y Wareham, 2010; Coyne *et al.*, 2011; Blair *et al.*, 2014; Lean *et al.*, 2016; Du *et al.*, 2018). Son relativamente grandes, formando un sistema tripartito compuesto por el transportador de membrana interna, la proteína adaptadora periplásmica (parcialmente responsable de la especificidad de sustrato) y el canal de membrana externa, abarcando por completo de ese modo la envoltura celular de las bacterias Gram negativas (Piddock, 2006a; Piddock, 2006b; Blair y Piddock, 2009; Gordon y Wareham, 2010; Blair *et al.*, 2014; Du *et al.*, 2018). La más relevante en *A. baumannii*, y la primera caracterizada es la bomba AdeABC, que posee un amplio rango de sustratos que incluye fluoroquinolonas, aminoglucósidos, β -lactámicos, tetraciclinas, macrólidos o cloranfenicol, entre otros (Magnet *et al.*, 2001; Poole, 2004; Poole, 2005; Gordon y Wareham, 2010; Coyne *et al.*, 2011). Otros ejemplos de esta familia bien caracterizados en esta especie son las bombas AdeIJK y AdeFGH, ambas también con un amplio rango de sustratos aunque carecen de la posibilidad de expulsión de aminoglucósidos, y la última tampoco tiene como sustrato los β -lactámicos (Gordon y Wareham, 2010; Coyne *et al.*, 2011). Los 3 sistemas se consideran relevantes para el fenotipo multirresistente, no obstante dado que también llevan a cabo funciones biológicas y son capaces de exportar otro tipo de sustancias, su sobreexpresión debe estar estrechamente regulada para evitar toxicidad u otros efectos secundarios, como la alteración de membrana, la formación de biofilm o la disminución en la adquisición de plásmidos, entre otros (Gordon y Wareham, 2010; Coyne *et al.*, 2011; Blair *et al.*, 2014; Hernando-Amado *et al.*, 2016). Estos sistemas suelen disponer de reguladores locales de dos componentes generalmente localizados corriente arriba, como es el caso de AdeRS que actúa sobre AdeABC (bomba sobreexpresada cuando el regulador se encuentra mutado), o BaeRS que actúa de manera conjunta sobre AdeABC y sobre AdeIJK, que está también involucrado en la adaptación celular al estrés (Poole, 2004; Peleg *et al.*, 2008; Coyne *et al.*, 2011; Lin y Lan, 2014; Hernando-Amado *et al.*, 2016; Du *et al.*, 2018). Si bien, están descritos otros reguladores para esas bombas, como el regulador AdeL responsable de la sobreexpresión de AdeFGH o el regulador AdeN sobre la bomba AdeIJK (Coyne *et al.*, 2011; Lin y Lan, 2014). Se considera que la bomba AdeIJK es la responsable de la resistencia intrínseca, por lo que su regulación es más estricta para evitar toxicidad celular (Coyne *et al.*, 2011; Lin y Lan, 2014). De forma característica, estas bombas no suelen requerir de todos los elementos para funcionar, como se ha visto en el sistema AdeABC, ya que pueden acoplarse a otras proteínas de membrana

externa o canales para llevar a cabo su función, y la pérdida de la subunidad AdeC no supondría en teoría ninguna desventaja (Pidcock, 2006a; Coyne *et al.*, 2011).

Superfamilia MFS. El grupo más grande y diverso de familia de transportadores, hallados en todos los dominios de la vida; formados generalmente como monómeros, aunque algunos miembros son fisiones de 2 MFS homólogos (Du *et al.*, 2018). Tienden a ser sustrato-específicas; y aunque se componen solo de la proteína transportadora de membrana interna, se asocian a veces con adaptadores periplásmicos y proteínas externas o canales de la membrana externa, formando un ensamblaje tripartido como la familia RND, para expulsar a los sustratos a través de la envoltura celular completa (Blair *et al.*, 2014; Hernando-Amado *et al.*, 2016; Du *et al.*, 2018). Este grupo cuenta con representantes tanto cromosómicos como plasmídicos, siendo algunos de sus ejemplos más representativos los que se tratan a continuación: CraA (cloranfenicol resistance *Acinetobacter*) es cromosómica y confiere resistencia intrínseca al cloranfenicol; AmvA también cromosómica que confiere resistencia a eritromicina pero que afecta principalmente a desinfectantes y detergentes; CmlA y FloR son adquiridas localizadas en isla de resistencia que confieren resistencia al cloranfenicol; Tet es también adquirida y suele encontrarse en plásmidos, confiriendo resistencia a tetraciclinas y siendo las formas TetA y TetB las más prevalentes (Poole, 2005; Peleg *et al.*, 2008; Gordon y Wareham, 2010; Rajamohan *et al.*, 2010; Coyne *et al.*, 2011; Blair *et al.*, 2014; Lin y Lan, 2014). Junto con la familia RND, los miembros de la superfamilia MFS son los que se encuentran más frecuentemente asociados a la resistencia antimicrobiana.

Familia MATE. Utilizan el gradiente transmembrana de protones o iones sodio para dirigir la expulsión de fármacos poliaromáticos y catiónicos (Blair *et al.*, 2014; Du *et al.*, 2018). Estas proteínas estructurales se encuentran en todos los aislados, sin una relación directa con la resistencia (Coyne *et al.*, 2011). No obstante, existen ejemplos cuya vinculación con el aumento de sensibilidad a los fármacos está claro, como la bomba adquirida AbeM, capaz de alojar y expulsar sustratos diversos como aminoglucósidos, fluoroquinolonas, eritromicina o cloranfenicol, entre otros, aunque su papel principal está más relacionado con los primeros (Peleg *et al.*, 2008; Gordon y Wareham, 2010; Coyne *et al.*, 2011; Lin y Lan, 2014). Se está resaltando cada vez más la importancia de miembros de esta familia en patógenos Gram negativos en la resistencia de agentes específicos (Poole, 2005).

Familia SMR/PACE. Como se mencionaba en la introducción del presente apartado, se ha encontrado recientemente una proteína capaz de expulsar clohexidina de estructura

similar a la familia SMR que se ha identificado como miembro de la nueva familia PACE, la bomba AceI, que confiere resistencia a bactericidas sintéticos (Du *et al.*, 2018). En aislados clínicos de *A. baumannii* se ha caracterizado la bomba AbeS, capaz de acomodar y exportar macrólidos, aminoglucósidos, quinolonas, tetraciclina, cloranfenicol, entre otros (Gordon y Wareham, 2010; Blair *et al.*, 2014).

Superfamilia ABC. Característicos por utilizar la hidrólisis de ATP como fuente de energía para el transporte de solutos (Blair *et al.*, 2014; Du *et al.*, 2018). Aunque los exportadores múltiples de esta familia comparten características y secuencia, las diferencias estructurales parecen ser el resultado de la diversidad de mecanismos moleculares hallados (Du *et al.*, 2018).

- **Modificación proteínas de membrana externa**

Las proteínas de membrana externa, además de participar en la virulencia tienen un papel importante en los mecanismos de resistencia (Lin y Lan, 2014). El balance entre la toma y la eliminación de un antibiótico determina la sensibilidad de esa bacteria a un compuesto particular. Por ello, los defectos en la permeabilidad como consecuencia de la reducción o pérdida de canales proteicos o porinas de membrana externa resulta en la disminución de entrada de los fármacos en la célula bacteriana, si bien se considera que *A. baumannii* posee pocas porinas comparado con otros patógenos Gram negativos (Sirijan y Nitaya, 2006; Gordon y Wareham, 2010; Lin y Lan, 2014). Es el caso de la porina CarO, que forma canales no específicos, cuya pérdida por la disrupción del gen *carO* por la secuencia de inserción IS*Aba1*, ocasiona resistencia a carbapenémicos como meropenem e imipenem (Peleg *et al.*, 2008; Gordon y Wareham, 2010; Lin y Lan, 2014). Otro ejemplo asociado con la resistencia o disminución de la sensibilidad a antibióticos carbapenémicos, es la pérdida de la porina homóloga a OprD en *P. aeruginosa*, la principal entrada de dichos compuestos a la célula bacteriana (Poole, 2005; Gordon y Wareham, 2010).

A nivel de membrana externa, cambios en las proteínas PBPs ocasionados por mutaciones en el gen codificante de dichas proteínas causan productos de baja afinidad para los antibióticos β -lactámicos, contribuyendo así a la resistencia a esos compuestos (Sirijan y Nitaya, 2006; Lin y Lan, 2014).

d. Persistencia de *A. baumannii* en el ambiente hospitalario

La ubicuidad y propensión para colonizar tanto la piel humana como las superficies inanimadas secas, junto con su habilidad para desarrollar resistencia antibiótica estable, hace de *Acinetobacter* un patógeno común, aunque difícil de tratar en el ambiente hospitalario. *A. baumannii* ha estado involucrado en un creciente número de brotes a lo largo del mundo, especialmente en UCIs, donde pueden persistir durante largos periodos de tiempo (Dijkshoorn *et al.*, 2007; La Forgia *et al.*, 2010).

La OMS define una infección nosocomial como aquella que no está presente en la admisión del paciente en el hospital, sino que se desarrolla durante su estancia. A nivel de prevención, se diferencian aquellas causadas por un cambio en la flora endógena durante su estancia que causa la infección, y las causadas por una contaminación cruzada, en las que el paciente entra en contacto con el agente infeccioso durante su estancia; siendo desde el punto de vista de prevención estas últimas las más importantes (WHO, 2014).

Los problemas que causan los aislados de *A. baumannii*, así como de especies relacionadas en los hospitales, se ve exacerbado por el alto grado de resistencia de estos organismos a la desecación y a los desinfectantes, y la creciente proporción de cepas multirresistentes, lo que los hace difíciles de erradicar una vez son endémicos (Dijkshoorn *et al.*, 2007; Towner, 2009). Existen autores y trabajos que sostienen que entre los factores que facilitan la supervivencia y dispersión de estos patógenos en el ambiente bajo condiciones desfavorables y desecación destacan su capacidad de formación de biofilm (Nait Chabane *et al.*, 2014), su capacidad de adquirir resistencia a antimicrobianos y biocidas (Gayoso *et al.*, 2014) o una colaboración entre estas dos características (Espinal *et al.*, 2012; Greene *et al.*, 2016; Bardbari *et al.*, 2017; Johani *et al.*, 2017; Farrow *et al.*, 2018). Del mismo modo, este patógeno posee una capacidad extraordinaria para adaptarse a condiciones variables, por lo que debe contar con mecanismos efectivos de respuesta al estrés (Dijkshoorn *et al.*, 2007).

i. Factores que permiten su persistencia ambiental

Acinetobacter baumannii ha emergido en las últimas décadas como un patógeno nosocomial relevante, siendo el responsable de numerosos brotes y/o epidemias hospitalarias muy difíciles de eliminar. Resulta muy común encontrar como fuente de dichos brotes una contaminación ambiental, sobre todo en habitaciones o instalaciones en las que

previamente haya habido ocupación de un paciente infectado o colonizado por *A. baumannii* (Chemaly *et al.*, 2014).

La capacidad de esta especie de sobrevivir sobre superficies secas en el ambiente se ha asociado a su gran tolerancia a la desecación debido, al menos en parte, a la capacidad de formar biofilms. Además, numerosas cepas clínicas resultan particularmente resistentes o tolerantes a antisépticos, agentes de limpieza y desinfección usados de manera rutinaria en la práctica clínica diaria; lo que, junto con las elevadas tasas de fenotipos multirresistentes, convierte a *A. baumannii* en el ambiente hospitalario en un grave riesgo para la salud.

Para mitigar el papel de la contaminación ambiental en la transmisión u origen de brotes, diversos estudios han investigado los beneficios de unas mejores prácticas de limpieza, incluyendo diferentes métodos para evaluar la eficacia de la limpieza, la carga microbiana sobre superficies con las que hay mucho contacto, y la relación con estándares de limpieza (Otter *et al.*, 2013; Johani *et al.*, 2017; López-Gigosos *et al.*, 2017; Doll *et al.*, 2018).

- Resistencia a la desecación

Acinetobacter baumannii es capaz de sobrevivir sobre distintas superficies en ambientes desfavorables como el hospitalario durante largos periodos de tiempo (Jawad *et al.* 1996; Espinal *et al.*, 2012; Bravo *et al.*, 2016; Greene *et al.*, 2016; Bardbari *et al.*, 2017; Doll *et al.*, 2018). De hecho, diversos trabajos han establecido que la capacidad de los miembros del género *Acinetobacter*, sobre todo del complejo Acb, para la persistencia ambiental es mayor que para otros bacilos Gram negativos (Jawad *et al.*, 1996; Houang *et al.*, 1998; Jawad *et al.*, 1998; Chemaly *et al.*, 2014). Esto es principalmente debido a su capacidad de sobrevivir en condiciones de desecación e incluso de privación de nutrientes, visto por primera vez para *Acinetobacter* en 1978 (Buxton *et al.*, 1978). Dicha habilidad parece estar directamente relacionada con la capacidad de los aislados de esta especie para formar biofilms sobre superficies no solo bióticas, como tubos endotraqueales, sino también abióticas como pueden ser el mobiliario, los dispositivos médicos, los catéteres y las sondas (O'Toole y Kolter, 1998; Tomaras *et al.*, 2003; Rodríguez-Baño *et al.*, 2008; Gaddy y Actis, 2009; Espinal *et al.*, 2012; Longo *et al.*, 2014; Nait Chabane *et al.*, 2014; Flemming *et al.*, 2016; Greene *et al.*, 2016; Vijayakumar *et al.*, 2016; Bardbari *et al.*, 2017; Farrow *et al.*, 2018). Desde que Vidal y colaboradores (Vidal *et al.*, 1996) describieron la formación de biofilm sobre cristal por parte de un aislado clínico de *A. baumannii* de tracto respiratorio, consistente en material amorfo

de exopolisacárido; son muchos los datos recopilados sobre la capacidad de este patógeno para formar fuertes y robustos biofilms sobre superficies bióticas y abióticas.

Como se ha mencionado previamente, aunque existen discrepancias sobre el tipo de relación existente entre los fenotipos MDR y la robustez del biofilm formado por esas cepas, todos los datos ponen de manifiesto que una vez constituida dicha estructura, las células bacterianas de su interior son más resistentes al tratamiento antibiótico (Lee *et al.*, 2007; Kvist *et al.*, 2008; Rodríguez-Baño *et al.*, 2008; Gaddy y Actis, 2009; Espinal *et al.*, 2012; Greene *et al.*, 2016; Qi *et al.*, 2016; Bardbari *et al.*, 2017; Runci *et al.*, 2017). Este incremento en la resistencia al tratamiento se ha asociado a una permeabilidad menor de los compuestos a través de la matriz, a una tasa metabólica baja necesaria para la actividad de muchos fármacos y a una sobreexpresión de las bombas de expulsión por parte de las células del biofilm, lo que produce en ocasiones una co-resistencia a agentes de limpieza o desinfección (Vidal *et al.*, 1996; Kvist *et al.*, 2008; Flemming *et al.*, 2016; Qi *et al.*, 2016; Runci *et al.*, 2017; Bardbari *et al.*, 2017). También se ha visto que las células embebidas en la matriz pueden ser seleccionadas con concentraciones subletales de antibióticos y capaces de adquirir resistencias por transferencia horizontal, favoreciendo de ese modo la dispersión de las mismas (Lee *et al.*, 2007; Merod y Wuertz, 2014; Badave y Dhananjay, 2015; Qi *et al.*, 2016).

Está bien establecida la relación negativa que existe entre la presencia de hierro y la formación de biofilm, por lo que algunos autores sugieren la utilización de metales tipo ferroso en el recubrimiento de superficies hospitalarias o dispositivos médicos con el fin de evitar la adherencia de estos patógenos y su dispersión (Tomaras *et al.*, 2003; Gaddy y Actis, 2009; Runci *et al.*, 2017). De hecho, esta relación resalta la participación del biofilm en la tolerancia a la desecación, ya que aquellas que muestran elevados ratios de Mn/Fe son resistentes a la deshidratación pero no la proporción contraria, lo que se cree debido al alto nivel de daño en proteínas dependientes de hierro (Fredrickson *et al.*, 2008). Una característica interesante de la formación del biofilm es que es un proceso tanto estático como dinámico, lo que explica que puedan persistir en ambientes médicos sobre superficies y sometidos a corrientes hidrodinámicas como catéteres o tubos (Tomaras *et al.*, 2003; Flemming *et al.*, 2016).

El proceso de desecación, como estrés celular que es, genera especies reactivas de oxígeno (ROS) que causan daño celular oxidativo, afectando adversamente a la membrana, componentes proteicos y ácidos nucleicos; por lo que las bacterias desarrollan diferentes

mecanismos para proteger a sus componentes celulares y retener agua (Jawad *et al.*, 1996; Ramos *et al.*, 2001; Fredrickson *et al.*, 2008; Farrow *et al.*, 2018). Dado que la oxidación proteica es un determinante clave en la tolerancia a la desecación, la protección frente al daño oxidativo es fundamental para su supervivencia (Ramos *et al.*, 2001; Fredrickson *et al.*, 2008). *A. baumannii* aumenta el número de chaperonas moleculares en respuesta a la desecación, para prevenir la agregación proteica y asegurar su correcto plegamiento; pero también de proteínas involucradas en la protección al estrés oxidativo como son las involucradas en procesos redox o las asociadas al transporte (Gayoso *et al.*, 2014; Farrow *et al.*, 2018). Dado que los ácidos nucleicos también se ven afectados, la funcionalidad de reparación del ADN y de los sistemas de replicación determinará si las células bacterianas se recuperan de y sobreviven a dicho estrés (Ramos *et al.*, 2001; Fredrickson *et al.*, 2008).

Aunque la membrana externa de bacterias Gram negativas es una barrera muy conservada, su composición lipídica de ácidos grasos determina la tolerancia a la desecación en *A. baumannii* (Ramos *et al.*, 2001; Boll *et al.*, 2015). Además, es capaz de modificar tanto la composición de la membrana como del lípido A del LPS para aumentar su estabilidad en condiciones de desecación, lo que junto con la producción de la matriz en el biofilm ayuda a las células bacterianas a retener agua (Boll *et al.*, 2015; Farrow *et al.*, 2018). Esos cambios en la composición afectan a la fluidez de la misma, que repercute de manera directa sobre la permeabilidad, que se ve modificada no solo por la disponibilidad de agua sino también por la limitación de nutrientes (Ramos *et al.*, 2001; Gayoso *et al.*, 2014). La desecación, además de provocar cambios en la composición de la membrana, también lo hace sobre otros componentes de la misma, como las bombas de expulsión y los sistemas de secreción tipo VI (Gayoso *et al.*, 2014). La modificación o alteración de la composición de la membrana, y con ello de su fluidez es una respuesta inespecífica al estrés, ya que entre otros cambios fenotípicos disminuye la sensibilidad de las bacterias a desinfectantes y antisépticos (Ramos *et al.*, 2001; Martró *et al.*, 2003).

La pérdida de agua en las células bacterianas provoca una contracción de la pared, junto con un incremento en la concentración de sales para disminuir así el volumen celular (Nocker *et al.*, 2012). En una población o biofilm de células de *A. baumannii* expuestas a desecación predominan las formas cocoides sobre los bacilos, ya que esa reducción en el tamaño celular permite aumentar la capacidad de toma de solutos (James *et al.*, 1995; Houang *et al.*, 1998; Gayoso *et al.*, 2014). Por el mismo motivo, en esas células existe represión de las proteínas involucradas en la división celular y un reducido ratio de síntesis proteica.

- Resistencia a los desinfectantes y alcohol

Agentes biocidas como antisépticos y desinfectantes son ampliamente utilizados en los hospitales, como prevención de transmisión o para la descontaminación del ambiente, por lo que su uso adecuado es fundamental para prevenir las infecciones nosocomiales causadas por patógenos hospitalarios. Existe un creciente interés en la prevención de infecciones adquiridas en el hospital, ya que infecciones con este tipo de patógenos incrementa la mortalidad y morbilidad de los pacientes además de suponer un importante aumento de los costes sanitarios. Existen numerosos estudios que han establecido una relación entre la contaminación ambiental por patógenos nosocomiales y el riesgo de adquirir infecciones por ellos (Otter *et al.*, 2013; Chemaly *et al.*, 2014; Bardbari *et al.*, 2017; Doll *et al.*, 2018). De modo que, se han elaborado numerosas guías para la correcta práctica de limpieza y desinfección, con el fin de prevenir o tratar posibles brotes hospitalarios (APIC, 2010; WHO, 2014; SEIMC, 2015).

La OMS en su guía también ha establecido las diferencias en las características que deben poseer los biocidas antisépticos y desinfectantes (WHO, 2014). Un antiséptico es aquel compuesto no tóxico que presenta una actividad rápida y adecuada sobre un microorganismo tras una elevada exposición. Un desinfectante en cambio debe presentar una actividad adecuada frente a un microorganismo que se encuentra en elevada cantidad y protegido por residuos o materia orgánica (biofilm). Algo importante a tener en cuenta en la elección de los antisépticos es su efecto antimicrobiano persistente, es decir, la capacidad de permanecer en la piel tras su aplicación para retrasar la reaparición de flora endógena o disminuir el riesgo de aparición de bacterias exógenas en caso de que hubiera exposición (López-Gigosos *et al.*, 2017).

También es necesario resaltar que la actividad *in vitro* de un biocida no se traduce siempre en sensibilidad al agente de las bacterias en el ambiente; lo que puede ser debido a que disminuye el tiempo de exposición al agente o la concentración se ve diluida por diversos factores (suciedad, materia orgánica) (Martró *et al.*, 2003; Peleg *et al.*, 2008; Otter *et al.*, 2013). De hecho, se ha visto una sensibilidad variable de cepas de *A. baumannii* ambientales frente a biocidas que tenían la misma actividad *in vitro* (Martró *et al.*, 2003).

Es relativamente común que los patógenos hospitalarios, incluyendo *Acinetobacter*, exhiban resistencia a los biocidas, bien de manera intrínseca o adquirida vía plasmídica (Chemaly *et al.*, 2014; Mahzounieh *et al.*, 2014). *A. baumannii* no solo muestra un elevado

grado de resistencia a antimicrobianos, sino también a desinfectantes, antisépticos y detergentes. Por ejemplo, los genes *qac* y *smr* codifican para proteínas transmembrana capaces de acomodar en ellos a antisépticos como los compuestos de amonio cuaternario (QACs), usados como antisépticos en heridas y desinfectantes en hospitales (Poole, 2005; Peleg *et al.*, 2008; Mahzounieh *et al.*, 2014). Dos de los antisépticos más empleados son clorhexidina, para el lavado de manos en los hospitales, y triclosán, en muchos agentes de limpieza, cuya exposición recurrente aumenta la resistencia de las bacterias a ellos (Martró *et al.*, 2003; Poole, 2005; Chemaly *et al.*, 2014).

Como ya se ha descrito previamente, los sistemas de multiexpulsión RND son los más prevalentes en *A. baumannii*, y poseen un amplio rango de sustratos que incluye no solo antibióticos sino también biocidas y detergentes. De hecho, algunos autores han establecido una relación entre el fenotipo MDR de *A. baumannii* y la sensibilidad disminuida a clorhexidina y otros desinfectantes (Perez *et al.*, 2011). En esta especie en concreto, AdeABC y AdeIJK son capaces de acomodar diversos desinfectantes, detergentes y antisépticos, y AdeFGH varios detergentes; la bomba AbeM (familia MATE) es capaz de expulsar triclosán; y la bomba AmvA (familia MFS) expulsa principalmente desinfectantes y detergentes (Coyne *et al.*, 2011; Kirchner *et al.*, 2013). Por otro lado, en diversos ensayos se ha visto que la exposición de esta bacteria a etanol no solo incrementa su crecimiento en medios que poseen etanol, sino que también controla su tolerancia a la sal, así como aumenta su patogenicidad sobre el modelo animal *Caenorhabditis elegans* (McConnell *et al.*, 2013). Este aumento en la virulencia se debe a genes localizados en islas de patogenicidad del genoma de *A. baumannii*; pero también se ha observado inducción en la expresión de la fosfolipasa C y en los sistemas de transporte de hierro y fosfato, por lo que la presencia de etanol en dispositivos médicos podría tener relevancia e impacto clínico (Perez *et al.*, 2011).

A menudo se encuentran superficies hospitalarias contaminadas, incluso tras procesos de desinfección; lo que ha llevado al desarrollo de intervenciones para reducir la contaminación que se traduce en una menor transmisión de los patógenos y una menor tasa de infección (Otter *et al.*, 2013; Weber *et al.*, 2013). Debido a esto se han implementado algunos sistemas de desinfección que no requieren contacto, como la luz UV, el vapor de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) o superficies antimicrobianas o autodesinfectantes (Weber *et al.*, 2013; Chemaly *et al.*, 2014; Doll *et al.*, 2018). En el caso de *A. baumannii* ya han sido identificados genes para catalasas responsables de la resistencia a H₂O₂, como son KatG y

KatE, la primera responsable de eliminar el daño peroxi que causa y la segunda directamente de la degradación del compuesto (Sun *et al.*, 2016; Farrow *et al.*, 2018).

ii. Transmisión de *A. baumannii* en el ambiente hospitalario

Se han descrito varias vías de entrada de *A. baumannii* a una sala o instalación sanitaria, desde pacientes colonizados a materiales contaminados, como almohadas. Una vez que ha sido introducido, dicho patógeno puede dispersarse al ambiente o a otros pacientes susceptibles (Dijkshoorn *et al.*, 2007). El ambiente hospitalario es una de las principales fuentes de transmisión, y por ende de infección, de *A. baumannii*, siendo más acusado e importante en instalaciones de cuidados intensivos, ya que las infecciones por patógenos MDR en UCIs aumenta la mortalidad hasta en un 500% (Wendt *et al.*, 1997; Martró *et al.*, 2003; Fournier y Richet, 2006; Wisplinghoff *et al.*, 2007; Johani *et al.*, 2017; Shamsizadeh *et al.*, 2017; Doll *et al.*, 2018). Se ha establecido que el origen de los patógenos causantes de infecciones asociadas al hospital o nosocomiales en las UCIs, de más a menos frecuentes son: la flora endógena del paciente, una infección cruzada por las manos del personal sanitario, los cambios en la flora endógena tras el tratamiento antibiótico y la contaminación ambiental (Weber *et al.*, 2013).

La prevención de brotes y epidemias debe centrarse en primer lugar en establecer una barrera entre la infección o contaminación y el entorno, lo que involucra el aislamiento de pacientes pero también técnicas asépticas y correctos protocolos de limpieza y desinfección (WHO, 2014).

Existen diversas evidencias que ponen de manifiesto la importancia de las superficies contaminadas en la transmisión de patógenos o en el origen de brotes. Entre ellas, cabe destacar que las habitaciones de pacientes infectados por un patógeno suelen estar también contaminadas con ese mismo microorganismo; el contacto con el personal lleva a la contaminación de manos y guantes, y existe una correlación en la frecuencia de contaminación de las superficies y de las manos del personal y el riesgo de ocupación previa (Dijkshoorn *et al.*, 2007; Wisplinghoff *et al.*, 2007; McConnell *et al.*, 2013; Morgan *et al.*, 2013; Weber *et al.*, 2013). De hecho, las manos del personal sanitario en instalaciones hospitalarias se considera el vehículo más frecuente para la infección nosocomial (Dijkshoorn *et al.*, 2007; WHO, 2014). No obstante, en un estudio se detectó la presencia de *Acinetobacter* en manos del personal que no había tenido contacto con pacientes portadores de dicho patógeno, lo

que resalta su dispersión y amplia presencia en el ambiente hospitalario (Mahzounieh *et al.*, 2014).

El riesgo de ocupación previa hace referencia a la posibilidad aumentada de que un nuevo paciente se contamine o infecte con el patógeno que portaba el paciente anterior como consecuencia de la contaminación del ambiente. Este riesgo se ve aumentado en el caso de *A. baumannii* en 3,5 veces, el mayor de los patógenos MDR analizados, la cual se considera la especie más común asociada a infecciones hospitalarias (Dijkshoorn *et al.*, 2007; Otter *et al.*, 2013; Chemaly *et al.*, 2014; Doll *et al.*, 2018).

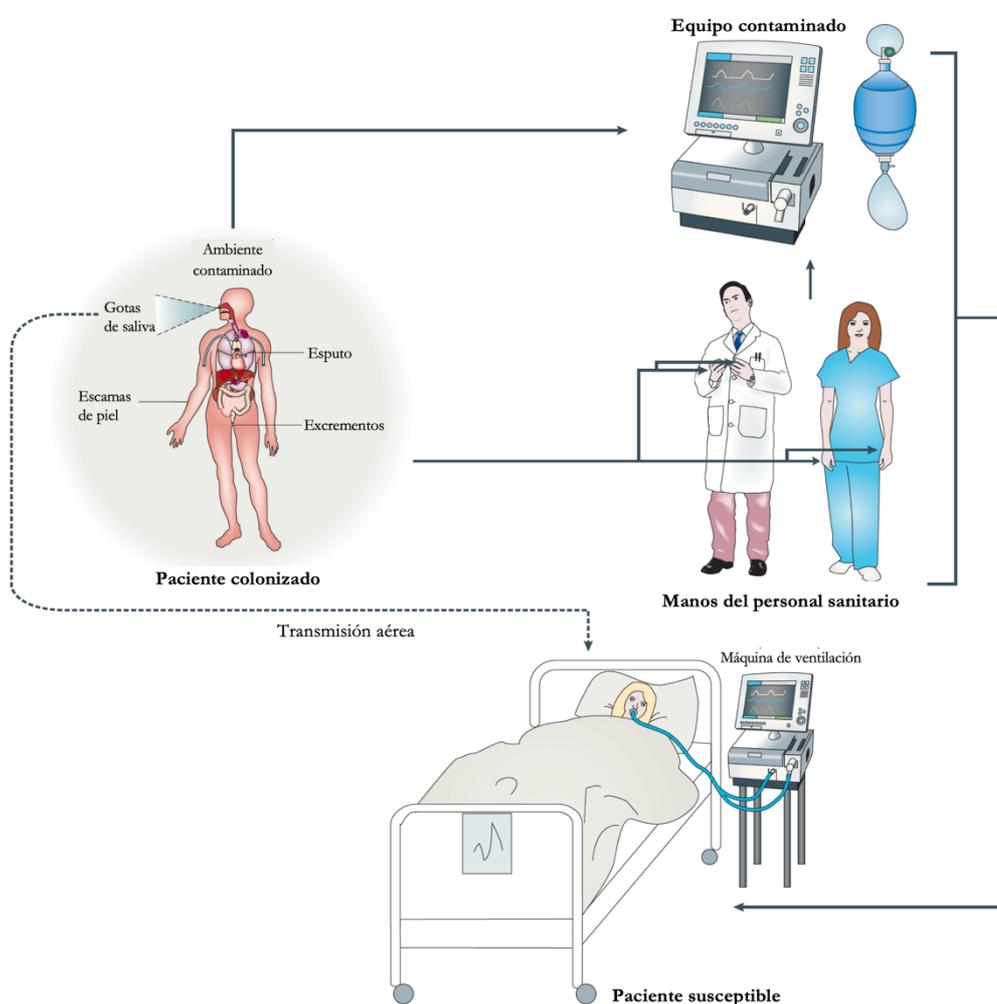


Figura 8: Vías de transmisión del patógeno *A. baumannii* en el ambiente hospitalario. Partiendo de un paciente colonizado, a través de diferentes vías, los patógenos pueden alcanzar el equipo médico y las manos del personal sanitario por contacto directo; o mediante ruta aérea a un nuevo paciente susceptible de colonización y/o infección. Del mismo modo, el equipo y las manos del personal contaminados, mediante contacto indirecto con un nuevo paciente pueden transferirle la bacteria potencialmente patógena. Adaptado de Dijkshoorn *et al.*, 2007.

Dado que no existe, o es muy poco frecuente, el contacto entre dos pacientes, la transmisión y contaminación se debe en gran medida al contacto indirecto, o bien con las superficies contaminadas o con la ropa o guantes de personal sanitario portador; aunque también participa la ruta aérea, como se muestra de manera esquemática en la Figura 8 (Morgan *et al.*, 2013; Otter *et al.*, 2013; Chemaly *et al.*, 2014; Lin y Lan, 2014; Johani *et al.*, 2017; Shamsizadeh *et al.*, 2017). Si bien la adquisición y dispersión de *A. baumannii* parece estar relacionada con un gran número de variables, la más importante parece ser la deficiencia en la implementación de las guías de control de infección, así como el uso de antibióticos de amplio espectro (Lin y Lan, 2014).

En un estudio reciente, se evidenció que más del 75% de las habitaciones de pacientes infectados por *A. baumannii* MDR estaban contaminadas con el patógeno; además, en 1 de cada 3 interacciones del personal con el paciente, la bacteria era transmitida, lo que representa una frecuencia mucho más elevada que para otros patógenos MDR (Morgan *et al.*, 2013). A la vista de esta facilidad de dispersión y transmisión, la *Society for Healthcare Epidemiology of America* propuso la reducción del uso de batas en el entorno clínico, algo que ha sido apoyado por diversos colectivos (Chemaly *et al.*, 2014).

e. Factores genéticos que permiten su rol como patógeno nosocomial

Poco se sabe de los mecanismos bacterianos que permiten el éxito del patógeno *A. baumannii* en el ambiente hospitalario (Dijkshoorn *et al.*, 2007). No obstante, el uso de modelos animales, junto con secuenciación de varios genomas de *A. baumannii*, ha permitido identificar factores de virulencia que han contribuido al éxito de esta especie como patógeno nosocomial (McConnell *et al.*, 2013).

Bien conocida es la flexibilidad o plasticidad genética de las cepas de esta especie, con una alta capacidad para reorganizar, agregar o eliminar genes que codifican, entre otros, productos de la superficie celular bacteriana, como factores de virulencia, y así lo muestran los análisis de recombinación homóloga en cepas hospitalarias causantes de brotes (Adams *et al.*, 2008; Peleg *et al.*, 2008; Snitkin *et al.*, 2011; McConnell *et al.*, 2013). Las cepas de esta especie suelen, además, disponer de un amplio repertorio de elementos genéticos móviles (portadores de genes que codifican a enzimas modificadoras de medicamentos) así como secuencias de inserción e islas de resistencia. Algo característico también de este microorganismo es el tamaño relativamente pequeño de su genoma core, poseyendo a su vez un gran genoma accesorio (Perez *et al.*, 2011; McConnell *et al.*, 2013).

Ya se ha expuesto que *A. baumannii* posee una gran capacidad para sobrevivir y prosperar en entornos hospitalarios, debido a su capacidad para interactuar con diferentes tipos de superficies y formar biofilms sobre ellas. Por esto, los factores genéticos que determinan la capacidad de esta bacteria para formar biofilms sobre superficies abióticas podrían considerarse los principales responsables de su éxito como patógeno nosocomial. Dentro de esta característica podrían destacarse los genes del operón *csu*, el gen *ompA* para la proteína de membrana y el sistema regulador de dos componentes *bfmRS* (Tomaras *et al.*, 2003; Gaddy y Actis, 2009; Bravo *et al.*, 2016; Vijayakumar *et al.*, 2016). Un estudio reciente ha mostrado que BfmR es necesario para la tolerancia y/o resistencia a desecación, y que mutaciones que inactivan el gen *bfmR* reducen también significativamente su respuesta a otros tipos de estrés como la exposición a H₂O₂, privación de nutrientes y aumento de la osmolaridad, situaciones a las que se ven expuestos los microorganismos que permanecen en las superficies de un hospital (Farrow *et al.*, 2018).

También es conocida la gran presión selectiva ejercida por los antibióticos de amplio espectro en la dinámica y evolución de *A. baumannii* en el entorno sanitario (Perez *et al.*, 2011). De modo que la plasticidad propia del genoma de esta especie, destacando su capacidad para adquirir determinantes de resistencia y reagrupar sus propios genes, podría considerarse como otro responsable importante de su supervivencia en instalaciones sanitarias modernas.

3. *Acinetobacter pittii*

Si bien la especie más problemática y patogénicamente relevante del género es *A. baumannii*, *A. pittii* está adquiriendo importancia por el aumento de especímenes aislados e identificados en muestras clínicas, probablemente como consecuencia de la mejora en la identificación de las especies del género (Peleg *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2013; Pailhoriès *et al.*, 2016). Debido a que las herramientas moleculares no suelen estar disponibles en la rutina clínica diaria, y como consecuencia de la elevada similitud fenotípica entre las diferentes especies, es probable que se haya infravalorado el potencial patogénico de esta especie, por lo que es de esperar que en el futuro aumenten el número de casos asociados a *A. pittii* (Horrevorts *et al.*, 1995; Molina *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2018). Además, la aparición de cepas de *A. pittii* resistentes a carbapenémicos que poseen β -lactamasas hidrolizantes de carbapenémicos, como NDM-1, se ha convertido en una gran preocupación médica (Bogaerts *et al.*, 2013; Pailhoriès *et al.*, 2016). No obstante, los datos clínicos son escasos, ya que los autores se centran en demostrar la transmisión cruzada del patógeno y sus características microbiológicas (Molina *et al.*, 2010).

La literatura sobre esta especie es muy escasa, y en su mayoría está enfocada a la comparación epidemiológica de las diferentes especies del complejo Acb. Cabe destacar que hasta el año 2011 no se propuso un nombre para esta especie, cuando se consideró su relevancia médica y la importancia clínica del taxón, momento hasta el cual se denominaba *Acinetobacter* genoespecie 3 (Nemec *et al.*, 2011). El nombre *A. pittii* se aprobó ese mismo año, junto con otra especie de relevancia clínica nosocomial, *A. nosocomialis*, también perteneciente al complejo Acb (Euzéby, 2011).

Las características fenotípicas de *A. pittii* (lleva el nombre de Tyrone Pitt, microbiólogo médico británico (Nemec *et al.*, 2011)) se corresponden con las descritas para el género (Baumann *et al.*, 1968). Son cocobacilos Gram negativos, estrictamente aeróbicos, oxidasa-negativos, catalasa-positivos, no móviles, capaces de crecer en medios minerales con acetato como única fuente de carbono y amoníaco como única fuente de nitrógeno; la morfología de las colonias tras 24 h de incubación es normalmente de 1-2 mm de diámetro, circulares, convexas, lisas y ligeramente opacas con márgenes completos; y no se observa hemólisis en medios de agar. La cepa tipo de *A. pittii* es LMG 1035T, aislada de líquido cefalorraquídeo de un ser humano antes de 1967 y que fue utilizada como la cepa de referencia de genoespecie 3 por Bouvet y Grimont (Bouvet y Grimont, 1986).

Al igual que en el caso de *A. baumannii*, la especie *A. pittii* resulta difícil de erradicar en instalaciones sanitarias por su capacidad para sobrevivir en entornos hostiles durante largos periodos de tiempo, lo que favorece su diseminación y la transmisión bacteriana entre pacientes, ya que también son capaces de colonizar dispositivos médicos tales como tubos de ventilación y catéteres, llegando a ser la infección sanguínea asociada a dispositivo más común por esta especie que por otras del género (Turton *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012; Peleg *et al.*, 2012; Wisplinghoff *et al.*, 2012; Pailhoriès *et al.*, 2016).

a. Epidemiología y patogénesis

La prevalencia de este patógeno es muy variable, probablemente debido a las diferencias epidemiológicas en cada centro, aunque parece estar más asociado a infecciones de piel y tejidos blandos incluyendo heridas quirúrgicas, mientras que *A. baumannii* lo hace a aislados respiratorios (Molina *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2013). De hecho, el número de aislados varía en diferentes estudios desde el 6% de los casos clínicos con infección por *Acinetobacter* spp. hasta el 39% (Boo *et al.*, 2009; van den Broek *et al.*, 2009; Molina *et al.*, 2010; Wisplinghoff *et al.*, 2012). Otra diferencia reseñable es que su aislamiento es más común en salas convencionales que en las UCIs (Horrevorts *et al.*, 1995; Joly-Guillou, 2005; Molina *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2013).

La patología más estudiada asociada con *A. pittii*, quizá por ser la de mayor gravedad, es la bacteriemia, y de nuevo la prevalencia de esta especie dentro del género es muy variada entre diferentes países. La distribución de las diferentes especies del complejo difiere tanto geográficamente que, por ejemplo, en Estados Unidos se estableció que un 8% de los casos de bacteriemia eran causados por *A. pittii*, mientras que en Noruega esta especie fue 7 veces más prevalente que *A. baumannii*, la especie más común a nivel mundial (Park *et al.*, 2013). Si bien tanto *A. pittii* como *A. nosocomialis* son más frecuentes en países del sudeste asiático, *A. pittii* parece ser más predominante en países del norte de Europa, como Dinamarca, Irlanda o Alemania (Wisplinghoff *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013). No obstante, un estudio reciente realizado en China mostró que las distintas especies mostraban misma distribución en la infección, colonización y mortalidad, cuando el origen de las muestras son aspirados traqueales (Chen *et al.*, 2018). Las infecciones con *A. pittii* presentan un índice de comorbilidad mayor que otras especies del género, más asociado a pacientes con neoplasias malignas, lo que parece indicar su predilección con pacientes con malignidad (Liu *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013).

El conocimiento de los factores de virulencia de esta especie o su papel en la patogénesis es muy limitado. Análisis de secuencias comparativas entre distintas especies del género *Acinetobacter* han identificado genes y clústeres exclusivos de especies patógenas, como son los genes que codifican para el sistema de adquisición de hierro acinetobactina y el operón *csu* (presentes en *A. baumannii* y *A. pittii*, únicamente), lo que sugiere su participación en la virulencia de esta especie (Peleg *et al.*, 2012). La pérdida del operón *csu* en *A. baumannii* conlleva la pérdida de pili de superficie y la adherencia a superficies abióticas, por lo que cabe esperar que cumpla un papel similar en la especie *A. pittii*.

b. Mecanismos de resistencia

Esta especie es más sensible a la mayoría de antibióticos (en general) que la especie *A. baumannii* (Lee *et al.*, 2011; Wisplinghoff *et al.*, 2012; Chusri *et al.*, 2014). No obstante, ya se han encontrado cepas con fenotipo MDR e incluso XDR, causantes de brotes hospitalarios en UCIs e infecciones nosocomiales relevantes (Horrevorts *et al.*, 1995; Evans *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2012; Turton *et al.*, 2010; Wisplinghoff *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2018). Curiosamente, las cepas de esta especie parecen presentar más resistencia a la colistina que la especie *A. baumannii*, al menos de manera global (Turton *et al.*, 2010; Chuang *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013).

Desde que se identificó por primera vez en 2007 una cepa resistente a carbapenémicos (Koh *et al.*, 2007), el número de cepas con fenotipos resistentes ha incrementado notablemente por su capacidad para acumular distintos mecanismos de resistencia, por lo que en muchos casos existe una disponibilidad de tratamiento limitada (Evans *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012). En el año 2010 se identificó por primera vez la duplicación mediada por secuencia de inserción del gen *bla_{OX4-58}* que codifica para una β -lactamasa en una cepa de *A. pittii*, cuyo entorno genético sugería la adquisición desde *A. baumannii*, una secuencia de inserción que contenía además de un promotor para dicho gen una transposasa (*IS_{Aba3}*) (Evans *et al.*, 2010).

Dado que *A. pittii* es genética y metabólicamente la especie más similar a *A. baumannii*, no es de extrañar que dispongan de mecanismos de resistencia similares a dicha especie, como enzimas modificadoras de aminoglucósidos, β -lactamasas (incluida *ampC*) o bombas de expulsión múltiple (Peleg *et al.*, 2012; Pailhoriès *et al.*, 2016). Se han identificado bombas de expulsión RND propias de esta especie, como AdeXYZ y AdeDE (Coyne *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013). La bomba AdeXYZ comparte el 97% de la identidad con AdeIJK,

responsable de la resistencia intrínseca a un amplio rango de sustratos (β -lactámicos, ciprofloxacino, tetracilinas, rifampicina, cloranfenicol) cuando se sobreexpresa; o la bomba AdeDE que comparte menos del 45% de identidad con AdeAB, también con amplio rango de sustratos (aminoglucósidos, carbapenémicos, fluoroquinolonas, macrólidos, tetraciclina) (Coyne *et al.*, 2011). Los genes para β -lactamasas *bla_{IMP}* y *bla_{VIM}* codificantes de metalo- β -lactamasas también son más comunes en *A. pittii* (Zhang *et al.*, 2013).

La presencia del gen cromosómico *bla_{NDM-1}* cada vez más extendido en cepas clínicas de *A. pittii* se ha convertido en un asunto de preocupación clínica. Hasta hace poco solo se habían encontrado estas cepas en países asiáticos, y en pocos casos en Europa asociados con viajes a dichos países, lo que resalta el riesgo de diseminación global de dicho gen; pero recientemente se ha identificado una cepa portadora del gen en Francia sin ninguna vinculación con ese origen (Bogaerts *et al.*, 2013; Pailhoriès *et al.*, 2016). En 2013 se encontró el gen en una cepa de *A. pittii* en un transposón previamente identificado en *A. baumannii*, pero en distinto plásmido con factores de virulencia, que resultó ser fácilmente transmisible a *E. coli*, lo que subraya el papel potencial de esta especie (junto con su capacidad para sobrevivir en el ambiente) como reservorio para la diseminación de resistencias a enterobacterias en entorno hospitalario (Bogaerts *et al.*, 2013).

4. Secuenciación, ensamblaje y anotación de genomas bacterianos

El primer genoma procariota completo se secuenció y ensambló hace más de dos décadas, de una bacteria perteneciente a la especie Gram negativa *Haemophilus influenzae* (Fleischmann *et al.*, 1995). Desde entonces, muchos han sido los avances tanto en las plataformas de secuenciación como en las herramientas bioinformáticas para su análisis, que han significado una importante reducción en el tiempo y los costes requeridos para la secuenciación de un genoma completo (Land *et al.*, 2015).

Debido a esto, cada vez más usuarios disponen de medios para secuenciar sus organismos de interés, por lo que desde 1995 ha habido un incremento muy significativo del número de genomas depositados en la plataforma GenBank (Benson *et al.*, 2017), como puede verse en la Figura 9, con un aumento casi exponencial desde la implementación de las tecnología de secuenciación masiva de nueva generación (NGS, del inglés **N**ext **G**eneration **S**equencing) (Land *et al.*, 2015).

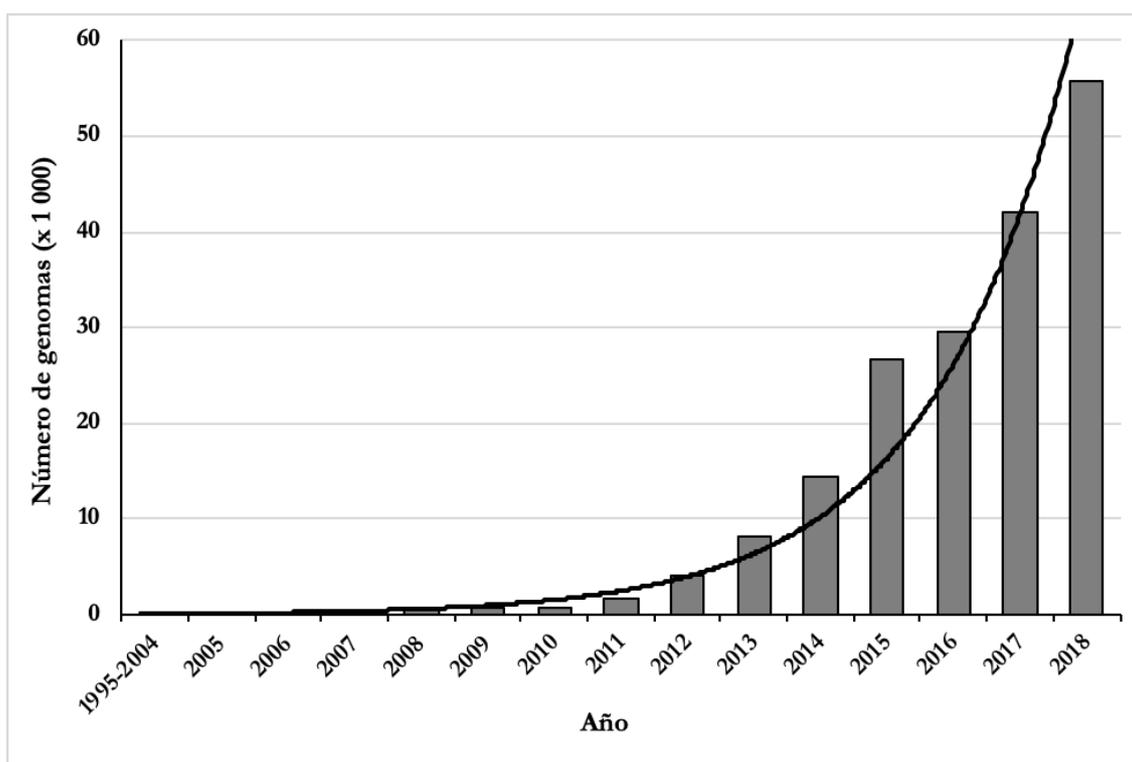


Figura 9: Relación de número de genomas procariotas secuenciados y depositados por año en la plataforma GenBank de NCBI. Número de genomas (en millares) de bacterias y arqueas secuenciados cada año, obtenido de GenBank en marzo de 2019, y línea de tendencia exponencial. Adaptado y completado de Land *et al.*, 2015.

a. Tecnologías para la secuenciación de genomas

Si bien las técnicas de secuenciación masiva de nueva generación son las empleadas a día de hoy casi de manera rutinaria, las primeras estrategias de secuenciación desarrolladas diferían de las actuales. En los años 70, se desarrolló la secuenciación Sanger basada en un método de terminación de cadena, muy empleada hasta hace poco más de una década ya que años después se consiguió automatizar el proceso (Sanger y Coulson, 1975; Sanger *et al.*, 1977; Liu *et al.*, 2012). A principios de siglo se desarrollaron los métodos ya conocidos como de nueva generación, que supusieron una revolución sobre todo económica, reduciendo considerablemente los costes de la secuenciación genómica, introducido por primera vez por Roche 454 y desarrollado posteriormente por Illumina como tecnologías de secuenciación de segunda generación (Liu *et al.*, 2012; Land *et al.*, 2015). Esta tecnología, también conocida como pirosecuenciación o secuenciación por síntesis, se basa en la detección de la liberación de pirofosfato durante la incorporación de nucleótidos a la cadena secuenciada. Para ello se emplean bases con diferentes fluoróforos asociados a cada uno (Liu *et al.*, 2012; Land *et al.*, 2015).

Posteriormente se desarrolló la secuenciación SMRT (Single Molecule Real Time) denominada de tercera generación, actualmente más usada, desarrollada por PacBio y MinION, cuya ventaja radica en que produce lecturas mucho más largas que las anteriores por lo que resulta más sencillo obtener ensamblados de genomas bacterianos completos y cerrados (Liu *et al.*, 2012; Land *et al.*, 2015).

Se han realizado varios estudios comparativos entre las diferentes plataformas y técnicas de secuenciación, así como en su aplicación en la microbiología clínica (Liu *et al.*, 2012; Quail *et al.*, 2012; Frey *et al.*, 2014), llegando a la conclusión general de que la elección de un sistema u otro radica principalmente en las disponibilidades y necesidades de cada organismo y/o estudio.

Como aplicaciones más importantes e inmediatas para la secuenciación genómica masiva pueden destacarse el manejo de brotes clínicos, análisis metagenómicos (de muestras biológicas o de material sanitario) y la caracterización y vigilancia de patógenos, con especial interés en el examen de nuevos aislados resistentes a antibióticos detectados en instalaciones sanitarias (Köser *et al.*, 2012; Deurenberg *et al.*, 2017). De hecho, el Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC) propuso en 2016 la WGS como el método de elección para el tipado de patógenos microbianos, justificándolo como una mejora en la

eficacia y exactitud de la vigilancia de enfermedades, la investigación de brotes clínicos y la evaluación de políticas de prevención mejorando las dinámicas de transmisión de resistencias antibióticas, con respecto a los métodos clásicos (ECDC, 2016).

- **Secuenciación NGS Illumina**

La secuenciación NGS mediante tecnología Illumina genera *short reads* (fragmentos cortos) de la misma longitud, sigue típicamente el siguiente proceso de trabajo. Las muestras se procesan *in vitro* para generar una librería de insertos cortos que, una vez superado el control de calidad, se secuencian mediante equipos MiSeq Illumina. Las lecturas producto de esta técnica pueden ser de 2 tipos, *single-reads* si se emplea únicamente un *primer forward* para secuenciar los fragmentos o *paired-reads* si en cambio se secuencian en ambos sentidos usando *primers* tanto *forward* como *reverse*.

- **Secuenciación SMRT PacBio**

La tecnología PacBio SMRT se basa en un sistema de secuenciación de *long reads* (fragmentos largos) que, a través de un algoritmo de trabajo, facilita la obtención de un solo *contig* por cromosoma o plásmido bacterianos. Esto es, partiendo de las lecturas iniciales, se ensamblan a través de un análisis de ensamblaje *de novo*, mediante el Hierarchical Genome Assembly Process version 3 (HGAP3), lo que incluye los procesos de ensamblaje en Celera Assembler y de “pulido” con Quiver (Chin *et al.*, 2013).

b. Herramientas bioinformáticas

Como resultado de la secuenciación masiva se obtienen una cantidad variable de secuencias de ADN denominadas lecturas. Como se ha dicho en el apartado anterior, en base a la tecnología empleada, las lecturas o fragmentos varían en tamaño, cantidad y calidad. Una vez obtenidas las secuencias proporcionadas por las empresas que ofrecen el servicio de secuenciación, son necesarios diferentes programas y procesos de análisis en función del objetivo buscado. Actualmente, existen numerosos programas a nivel de usuario que pueden ejecutarse en ordenadores de sobremesa sin necesidad de instalaciones especializadas.

i. Python

La capacidad para diseñar y escribir programas es una de las bases más importantes en el desarrollo de las herramientas bioinformáticas modernas, donde surge el lenguaje Python (Ekmekci *et al.*, 2016).

Python es un lenguaje de programación muy usado en comunidades científicas para aplicaciones bioinformáticas, debido a que posee muchas librerías científicas gratuitas disponibles. Cuenta con muchas herramientas compatibles con la mayoría de sistemas operativos, y trabaja junto con otras bases de datos y/o servidores para su aplicación en ambientes científicos y académicos (Cock *et al.*, 2009). Su extendida utilización ha llevado al empleo de sus librerías y herramientas para proyectos de programación más avanzados (Ekmekci *et al.*, 2016).

ii. Ensamblaje de secuencias procedentes de WGS

Uno de los primeros pasos que suele ser necesario para realizar el análisis de la secuencia completa de un genoma es el ensamblaje de las lecturas de fragmentos. Dicho proceso consiste en el alineamiento y unión de las lecturas en fragmentos mayores con el fin de obtener la secuencia ordenada del genoma.

Si bien existen distintos algoritmos o programas para ensamblar genomas, Unicycler es un programa desarrollado en Python, ampliamente extendido por su facilidad de uso y calidad de los resultados. Unicycler es un programa para ensamblaje de genomas bacterianos que puede emplearse tanto con lecturas cortas (Illumina) como largas (PacBio SMRT), generando al final ensamblajes completos y a bajo coste. Este programa parte del grafo de De Bruijn, construido por el ensamblador *de novo* SPAdes durante un ensamblaje inicial de las lecturas cortas. Para ello SPAdes usa un amplio rango de tamaños de k -mers (secuencias de k nucleótidos), con valores que abarcan del 20 al 95% de los fragmentos de lectura. Por regla general este primer ensamblaje *de novo* no consigue cerrar la secuencia completa, tanto por la existencia de huecos como por la presencia de secuencias repetitivas que imposibilitan que el grafo pueda resolverse. Es por ello que Unicycler aplica una serie de reglas heurísticas que, junto a la información de las lecturas largas, posibilitan la simplificación final del grafo y una eventual obtención del genoma completo correctamente resuelto (Wick *et al.*, 2017).

Dado que es posible que se genere contaminación en los conjuntos de lectura de secuenciación, este programa elimina *contigs* con una longitud inferior a la mitad de la mediana de la longitud del gráfico, a menos que al hacerlo no obtuviera resultado. De este modo, se elimina más contaminación mientras que estructuras gráficas importantes permanecen intactas (Wick *et al.*, 2017).

iii. Anotación de genomas bacterianos

Una vez obtenido un genoma completo o parcialmente ensamblado, el siguiente paso que suele llevarse a cabo es la anotación del mismo, con el fin de definir los elementos que lo componen y asignarles información biológica si estuviera disponible, así como identificadores a los productos si han sido previamente identificados en las diversas bases de datos. De modo que la anotación del genoma es el proceso de identificar, clasificar y etiquetar todas las características relevantes de una secuencia genómica (Richardson y Watson, 2012).

Debido al creciente número de genomas microbianos secuenciados gracias a la tecnología NGS, la necesidad de un sistema rápido y eficaz de anotación ha llevado al desarrollo de programas de anotación genómica completamente automáticos, del mismo modo que sucede con el proceso de ensamblado (Richardson y Watson, 2012).

El proceso de anotación de alta calidad emplea software de predicción de genes y la transferencia de la anotación de genomas relativamente cercanos (Richardson y Watson, 2012). Existen diferentes programas y bases de datos (GenBank, EMBL) que realizan este proceso, algunas de las principales se explican a continuación.

- RAST

RAST, de sus siglas en inglés *Rapid Annotation using Subsystems Technology*, es un servidor de anotación automática (<http://rast.nmpdr.org/>) para genomas microbianos introducido en 2007, y construido en el marco de trabajo de sistema de base de datos SEED. El éxito de esta base de datos radica en su capacidad para integrar anotaciones de una amplia variedad de fuentes y usarlas para mejorar nuestro conocimiento de genomas microbianos (Overbeek *et al.*, 2014). RAST está diseñado para producir anotaciones de genes codificantes de proteínas y ser capaz de extrapolarlas al mayor número de genomas posible.

RAST basa sus intentos de lograr precisión, consistencia e integridad en el uso de una librería de subsistemas creciente que es manualmente corregida y en familias de proteínas en gran parte derivadas de esos subsistemas; inicialmente se asigna una función, cuyos papeles se agrupan en subsistemas, determinando cuándo un grupo de conexiones génicas de uno determinado, son suficientes para ser considerados una variante activa del subsistema. Por ello, proporciona un entorno para explorar y comparar los genes anotados con los cientos de genomas mantenidos dentro de SEED (Aziz *et al.*, 2008). Además, proporciona información básica sobre el genoma como su posición taxonómica, el tamaño, número de

contigs del fichero, número de secuencias codificantes y ARNs y número de posibles anotaciones génicas, junto con el número total de subsistemas automáticamente determinado.

- **Prokka**

Prokka es una herramienta de software de línea de comando, que permite hacer una anotación completa de genomas bacterianos en un ordenador de escritorio (Seemann, 2014). Produce archivos de salida estándar para análisis posteriores o su visualización en buscadores de genomas.

Prokka coordina un conjunto de herramientas de software con el fin de lograr una anotación rica y de confianza de las secuencias bacterianas analizadas. Algunas de esas herramientas son las siguientes: Prodigal, para identificar las secuencias codificantes de proteínas (CDS) (Hyatt *et al.*, 2010); RNAmmer, para identificar los genes de ARN ribosómico (ARNr) (Lagesen *et al.*, 2007); Aragorn, para identificar los genes de ARN transferente (ARNt) (Laslett y Canback, 2004); SignalP, para identificar péptidos señal y regiones transmembrana (Petersen *et al.*, 2011); e Infernal, para identificar ARN no codificante (Kolbe y Eddy, 2011).

- **CARD**

CARD, de sus siglas en inglés *Comprehensive Antibiotic Research Database* (<http://arpcard.mcmaster.ca>) es un base de datos que integra información del resistoma, con el fin de facilitar el estudio y evaluar el impacto de la resistencia antibiótica en las poblaciones bacterianas, en su ecología y en la práctica clínica (McArthur *et al.*, 2013).

Pese a la existencia de muchas herramientas para la anotación general de genomas procariontas, la predicción del fenotipo de resistencia a partir de la secuencia genómica no es tan sencilla. La ventaja o el avance de este servidor es que incluye la identificación de, además de las enzimas modificadoras de antibióticos, las proteínas protectoras de la acción de los mismos y los componentes de las bombas de expulsión, a través de la utilización del identificador de genes de resistencia (RGI) (McArthur *et al.*, 2013).

- **ISfinder**

ISfinder (<https://www-is.biotoul.fr/blast.php>) es una base de datos dedicada a la colección de secuencias de inserción de genomas bacterianos, que cuenta también con una

amplia información sobre ellas y sobre transposones (Siguier *et al.*, 2006). Debido al número creciente de genomas secuenciados y anotados, se mantiene actualizada con las nuevas identificaciones.

Su flujo de trabajo está basado en herramientas BLAST de ejecución online, junto con la capacidad de alineamientos (Siguier *et al.*, 2006).

iv. Comparativa de genomas bacterianos

Gracias al aumento en el número de genomas secuenciados y anotados accesibles, resulta posible realizar comparaciones entre distintos organismos a nivel genómico. El análisis de un genoma bacteriano nos permite obtener información biológica sobre un organismo en concreto, mientras que al realizar el análisis comparado de varios genomas se obtiene información sobre la fisiología y/o la evolución de las especies u organismos comparados, proporcionando datos sobre el número de genes, la localización de los mismos, la cantidad de ADN no codificante o la conservación del material genético entre ellos (García-Romero, 2017).

La comparación de genomas facilita la identificación de proteínas que están conservadas a través de patógenos clínicamente críticos, ayudando a la caracterización funcional de nuevos genes y la identificación de nuevas posibles dianas terapéuticas, pese a que los datos para muchas características no están siempre accesibles sobre todo cuando se refiere a un grupo de patógenos concreto (Khan y Khan, 2016).

Mediante la comparación genómica global se puede extraer el pan-genoma y el genoma core o núcleo del conjunto de análisis, que suele ser a nivel de especie o género. El pan-genoma se conforma del genoma core que contiene los genes presentes en todos los genomas de análisis; y por un genoma accesorio o dispensable que se compone tanto de los genes ausentes en al menos uno de los objetos de estudio y los genes únicos de cada individuo, como se muestra en la Figura 10. De modo que el pan-genoma se compone del total de genes no redundantes propios de una especie, o género, según sea el objeto de estudio. El tamaño de este pan-genoma indica la plasticidad y el potencial de adaptación de la especie o género; teniendo en cuenta la limitación causada por el tamaño muestral (Snipen *et al.*, 2009). De manera general, el genoma core lo conforman genes relacionados con el mantenimiento de los aspectos básicos de la biología, mientras que el accesorio lo hacen aquellos asociados con funciones específicas, como la virulencia o la resistencia a antibióticos

(García-Romero, 2017). Los genes del genoma accesorio suelen ser específicos de cada especie, resultando de gran interés para el estudio de nuevas funciones.

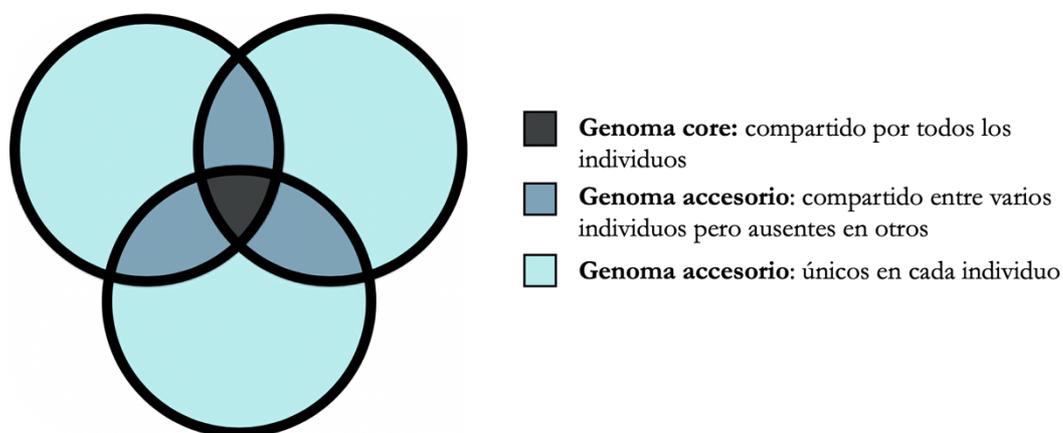


Figura 10: Representación de la composición del pan-genoma de un conjunto de 3 genomas.

Una de las herramientas que permite el análisis de pan-genoma mediante la predicción de genes o clusters de ortólogos es PanOCT (**Pan**-genome **ortholog clustering tool**), que permite a través del trabajo en línea de comando el análisis de especies procariontas o cepas cercanas (Fouts *et al.*, 2012). Este programa emplea coincidencias BLASTP y conservación del orden y orientación génica (CGN) en los genomas para predecir los clúster de proteínas ortólogas, proporcionando en última instancia el número de genes que corresponden a cada una de las categorías de composición del mismo. De manera complementaria, el programa PanGP (**Pan**-Genome **P**rofile **A**nalyze **T**ool) permite, mediante una representación gráfica, establecer la relación entre el tamaño del pan-genoma y el del genoma core (Zhao *et al.*, 2014).

La comparativa de genomas también dispone de herramientas y aplicaciones en el campo de la taxonomía. La disponibilidad actual de una gran cantidad de genomas secuenciados permite establecer relaciones filogenéticas entre microorganismos de manera más precisa. Aunque de forma tradicional se han realizado análisis de hibridación ADN-ADN (DDH) o de identidad de nucleótidos así como comparativa de las secuencias de los genes ARNr 16S y se siguen empleando, actualmente pueden producirse árboles más específicos que los generados por un único gen conservado, empleando por ejemplo un alineamiento de secuencias concatenadas o genes específicos de cada especie (Kumar *et al.*, 2002; Coenye *et al.*, 2005; Goris *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2016). Los valores de análisis DDH se llevan utilizando desde la década de los 60 para determinar la relación entre cepas y la limitación de las especies; si bien actualmente también se realiza el cálculo de la media de

identidad de nucleótidos (ANI) para el mismo fin, que tiene un rango de definición de especie más estricto que el anterior (Goris *et al.*, 2007).

Del mismo modo, gracias a la secuenciación masiva, se han desarrollado herramientas visuales para realizar la comparativa de varios genomas o partes de ellos de una forma más cualitativa. Para esto, uno de los programas más extensamente utilizados es BRIG (**B**LAST **r**ing **i**mage **g**enerator), que es capaz de generar una comparativa de genomas circulares procariontes entre ellos empleando un genoma de referencia, en base al porcentaje de identidad obtenido por el análisis BLAST (Alikhan *et al.*, 2011).

v. Identificación de plásmidos

Cuando se realizan análisis genómicos bacterianos hay que tener en cuenta que en muchos casos este está formado tanto por ADN cromosómico como por un número variable de información accesoria en forma de plásmidos. La identificación de los genes localizados en plásmidos o elementos móviles resulta de interés, sobre todo, para genes de resistencia antibiótica, ya que permite conocer su transmisibilidad así como trazar un seguimiento de los mismos.

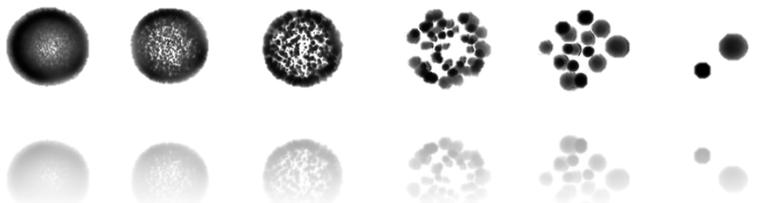
Muchos de estos métodos se basan en la identificación de genes típicamente específicos de plásmidos. En el caso de la secuenciación Illumina, muy utilizada hoy en día, se obtiene una gran cantidad de *contigs*, por lo que reconstruir los plásmidos de este conjunto resulta complicado. En este contexto, se ha desarrollado recientemente un método para diferenciar los *contigs* que pertenecen a los plásmidos de los que componen el cromosoma, denominado PLACNET (**p**lasmid **c**onstellation **n**etworks), que permite la identificación, visualización y análisis de los plásmidos creando una red de interacción de *contigs* (Toro *et al.*, 2014). La reconstrucción de los plásmidos puede analizarse usando dendrogramas de clúster que comparan la cantidad génica de cada plásmido, su cercanía evolutiva y la cantidad de proteínas que comparten entre ellos.

PLACNET es un programa en línea (<https://castillo.dicom.unican.es/upload/>) que, a partir del producto de secuenciación Illumina permite la identificación de los *contigs* que pertenecen a plásmidos, cuyo flujo de trabajo se basa en datos sobre la información de ensamblaje, la comparación con secuencias de referencia y característica de la secuencia de diagnóstico plasmídico (Lanza *et al.*, 2014).

Existen otros programas y aplicaciones para la identificación de estos elementos, pero su capacidad de análisis se ve en la mayoría de casos limitado a un grupo concreto de bacterias, como las enterobacterias en el caso de PlasmidFinder (Carattoli *et al.*, 2014).

Recientemente también se ha desarrollado el programa plasmidSPAdes, dentro del contexto del ensamblado SPAdes, que permite discriminar la presencia de *contigs* plasmídicos en genomas fragmentados, como los obtenidos en la secuenciación Illumina (Antipov *et al.*, 2016). PlasmidSPAdes es un programa que se ejecuta en línea de comando, y que tiene la capacidad de identificar los plásmidos dentro de genomas bacterianos mediante algoritmos de trabajo basados en la cobertura de los *contigs*, por lo que se ha propuesto como una herramienta para agregar dichas anotaciones a los genomas publicados en GenBank (Antipov *et al.*, 2016).

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



La utilización de los antibióticos en el tratamiento y prevención de infecciones bacterianas desde su descubrimiento a principios del siglo XX, ha permitido el desarrollo de la medicina moderna. No obstante, el mal uso y el abuso en la utilización de dichos compuestos han disminuido su eficacia, provocando un aumento significativo de las bacterias resistentes a ellos, considerándose este fenómeno un riesgo para la salud pública mundial. El problema es tal, que de continuar la tendencia actual, se estima que la tasa de mortalidad causada por bacterias multirresistentes alcanzará los 10 000 000 de muertes anuales en 2050, superando la mortalidad de otras enfermedades como el cáncer o las enfermedades cardiovasculares.

En este contexto, especies del género *Acinetobacter* han emergido en la última década como importantes patógenos nosocomiales, por su elevado nivel de resistencias antimicrobianas y su gran persistencia en el ambiente hospitalario. De hecho, la ECDC estima que cada año solo en la Europa se desarrollan cerca de 6000 infecciones por *Acinetobacter* spp. asociadas a instalaciones sanitarias, siendo el 35% de ellas debidas a cepas multirresistentes. En Estados Unidos, el CDC calcula que el número de esas infecciones asciende a 12 000 casos anuales, con un 63% causadas por bacterias MDR.

Los estudios de supervivencia de *Acinetobacter* en ambiente hospitalario son escasos en *A. baumannii* y prácticamente inexistentes en *A. pittii*, estando principalmente enfocados a evidenciar la capacidad de dichos patógenos de soportar condiciones de desecación sobre superficies inertes o de adherencia a las mismas. No obstante, la capacidad patogénica de esas bacterias tras las condiciones de estrés no ha sido evaluada. Del mismo modo, pese al aumento en el número de secuencias genómicas de *A. baumannii*, son pocas las cepas de *A. pittii* que han sido secuenciadas. Sin embargo, la información relacionada con plásmidos debe ser extraída de manera cuidadosa para inferir el contenido plasmídico real de estas cepas.

De manera que, respondiendo a las necesidades de estudios sobre capacidad de supervivencia y mantenimiento de la virulencia, así como de análisis genómico y plasmídico en *A. baumannii* y *A. pittii*, nos hemos propuesto desarrollar en esta Tesis Doctoral una investigación multidisciplinar acerca de la biología integrada y resistencia antimicrobiana en estas dos especies del género *Acinetobacter*.

En base a lo anteriormente expuesto, los obtenidos planteados en el presente trabajo han sido los siguientes:

Objetivo 1. Estudiar la supervivencia de cepas clínicas de *A. baumannii* y *A. pittii* bajo condiciones de ambiente hospitalario y analizar la existencia o no de un estado viable no cultivable.

Objetivo 2. Estudiar el impacto del cambio de ambiente sobre la virulencia de *Acinetobacter* spp. A su vez, se plantearon 2 subobjetivos:

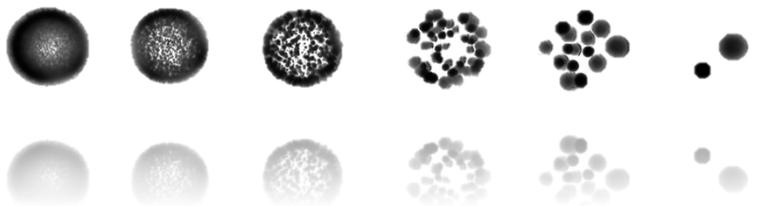
Objetivo 2.1. Analizar la capacidad de formación de biofilms de cepas de *A. baumannii* y *A. pittii* tras la permanencia en condiciones desfavorables.

Objetivo 2.2. Analizar la virulencia de cepas *A. baumannii* sometidas a falta de nutrientes y desecación en el modelo *Galleria mellonella* y la capacidad de resistencia a suero humano.

Objetivo 3. Secuenciar el genoma completo de cepas clínicas de *A. baumannii* y *A. pittii*, así como realizar análisis bioinformático. Detectar determinantes de resistencia y realizar estudios genómicos comparativos.

Objetivo 4. Analizar el contenido plasmídico de las cepas secuenciadas mediante software PLACNET. Detectar plásmidos mediante técnicas moleculares, caracterizarlos mediante la aplicación bioinformática y realizar estudios de estabilidad de los mismos.

MATERIALES Y MÉTODOS



1. Especies bacterianas y condiciones de cultivo

a. Cepas bacterianas

En esta Tesis Doctoral se han empleado 11 cepas clínicas del género *Acinetobacter*, 9 de ellas aisladas de pacientes del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV), Santander (España). Cuatro de estas 9 cepas patógenas pertenecen a la especie *A. baumannii*, mientras que las 5 restantes a la especie *A. pittii*. Junto a estos 9 aislados se incluyeron 2 cepas de colección, como cepas de referencia, una de cada especie. El origen y las siglas de cada una de las cepas se muestran a continuación en la Tabla 3:

| Nº de cepa | Especie | Siglas de cepa | Origen clínico |
|------------|--------------------------------|----------------|--------------------------|
| 1 | <i>Acinetobacter baumannii</i> | ATCC®19606™ * | Orina |
| 2 | <i>Acinetobacter baumannii</i> | HUMV 07-1319 | Exudado de herida |
| 3 | <i>Acinetobacter baumannii</i> | HUMV 04-2471 | Espuito |
| 4 | <i>Acinetobacter baumannii</i> | HUMV 06-2790 | Úlcera cutánea |
| 5 | <i>Acinetobacter baumannii</i> | HUMV 04-3743 | Exudado de herida |
| 6 | <i>Acinetobacter pittii</i> | LMG 10559 * | Aspirado traqueal |
| 7 | <i>Acinetobacter pittii</i> | HUMV 08-0315 | Espuito |
| 8 | <i>Acinetobacter pittii</i> | HUMV 08-4336 | Exudado de pie diabético |
| 9 | <i>Acinetobacter pittii</i> | HUMV 08-6207 | Exudado de herida |
| 10 | <i>Acinetobacter pittii</i> | HUMV 08-5918 | Exudado de herida |
| 11 | <i>Acinetobacter pittii</i> | HUMV 08-6483 | Orina |

Tabla 3: Relación de cepas de *Acinetobacter* empleadas.

ATCC: Colección americana de cultivo tipo; LMG: Colección de microorganismos belga coordinada; HUMV: Hospital Universitario Marqués de Valdecilla; * indican las cepas de colección de referencia.

Adicionalmente, como control negativo para los ensayos de sensibilidad al suero humano se emplearon dos cepas de *Escherichia coli* (J1: DH10B y J3: BL21 DE3), cedidas por el Dr. Eduardo Díaz del Centro de Investigaciones Biológicas CIB-CSIC (Madrid).

Del mismo modo, se incluyó una cepa extra de *A. baumannii* como control positivo de presencia de plásmido (HUMV 15-3637) para los análisis de identificación de los mismos.

b. Medios y condiciones de cultivo

El medio de cultivo de elección para todas las cepas empleadas fue el medio Luria (Indicia, Thermo Fisher Scientific), cuya composición se indica en la Tabla 4.

| Componentes | Cantidad (g/L) |
|----------------------|----------------|
| Triptona | 10,0 |
| Extracto de levadura | 5,0 |
| Cloruro de sodio | 0,5 |

Tabla 4: Composición del medio Luria. pH=7,0 ± 0,2. Tª=25°C.

Dichas bacterias también fueron cultivadas en medio infusión de cerebro-corazón (BHI) (Oxoid, Thermo Fisher Scientific), cuya composición se indica en la Tabla 5. En concreto, el medio BHI se usó para la conservación de las cepas en congelación (-80°C), suplementado al 20% (v/v) con glicerol (Merck) como agente crioprotector. Para ello, se partió de cultivos en medio líquido y agitación (175 rpm) incubados a 37°C durante la noche (cultivo *overnight*).

| Componentes | Cantidad (g/L) |
|---------------------|----------------|
| Infusión de cerebro | 12,5 |
| Infusión de corazón | 5,0 |
| Peptona | 10,0 |
| Glucosa | 2,0 |
| Cloruro de sodio | 5,0 |
| Fosfato disódico | 2,5 |

Tabla 5: Composición del medio BHI. pH=7,4 ± 0,2. Tª=28°C.

Por otro lado, para la determinación de la susceptibilidad a distintos antibióticos, el medio empleado fue Mueller Hinton (MH) (Difco, Thermo Fisher Scientific), cuya composición se indica en la Tabla 6, siguiendo las directrices del Instituto de Estándares de Laboratorio Clínico (CLSI) (CLSI, 2018).

| Componentes | Cantidad (g/L) |
|-----------------------------|----------------|
| Extracto de carne | 2,0 |
| Digerido de caseína de soja | 17,5 |
| Almidón | 1,5 |

Tabla 6: Composición del medio MH. pH=7,0 ± 0,2. T^a=25°C.

En todos los casos en que se realizaron cultivos en medio sólido, en la preparación de medios se añadió Agar (AppliChem, Panreac) en una proporción de 1,5% (p/v). Además, en el caso concreto de medio de recuperación para los ensayos de desecación, el medio Luria Agar (LA) se suplementó con diferentes concentraciones de piruvato sódico (LA+P) (0,5 y 1% [p/v]) (Fisher BioReagent, Fisher Scientific).

c. Curvas de crecimiento

Para las curvas de crecimiento se partió de bacterias de cultivo *overnight* (O/N); que se diluyeron 1000 veces (1:1000) en medio Luria, para posteriormente inocularse por triplicado en placas de microtitulación de poliestireno de 96 pocillos con fondo plano (Nunc, Thermo Fisher Scientific). Las condiciones de incubación fueron las siguientes, 37°C durante 24 h en un lector de placas de microtitulación Infinite[®] 200 (Tecan). La lectura de dichas placas se llevó a cabo a intervalos de 30 minutos, durante el periodo de 24 horas, a una longitud de onda de 600 nm, con agitación antes de cada ciclo.

2. Determinación de concentraciones mínimas inhibitorias (CMI)

Para la determinación de las CMIs se llevó a cabo el método estándar de microdilución de acuerdo a las directrices del CLSI (CLSI, 2018). Los inóculos se estandarizaron a una densidad óptica a 620 nm (DO_{620}) de 0,05, equiparable a la medida 0,5 unidades McFarland. Una vez ajustadas las densidades celulares, las cepas se inocularon por triplicado en placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo en U (Sarstedt), usando para ello el medio MH.

A continuación, se listan los antibióticos utilizados, así como el rango de concentraciones utilizadas en intervalos de dilución 1:2, como se indica en la Figura 11:

- Colistina: 0,125 – 8 $\mu\text{g/ml}$
- Meropenem: 0,25 – 16 $\mu\text{g/ml}$
- Ampicilina: 1 – 64 $\mu\text{g/ml}$
- Gentamicina: 0,50 - 32 $\mu\text{g/ml}$
- Tetraciclina: 0,50 – 32 $\mu\text{g/ml}$
- Eritromicina: 2 – 128 $\mu\text{g/ml}$
- Ciprofloxacino: 0,06 - 4 $\mu\text{g/ml}$

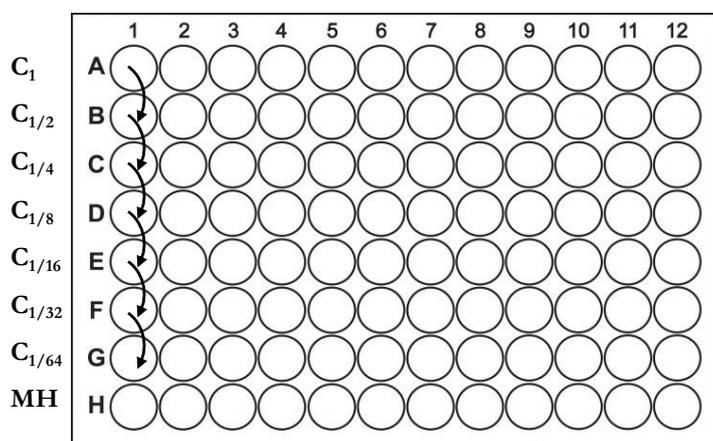


Figura 11: Esquema representativo de placa de 96 pocillos empleada para la técnica de microdilución para ensayos de sensibilidad antimicrobiana.

Se emplearon los puntos de corte establecidos por EUCAST para *Acinetobacter* spp., para clasificar cada cepa como sensible o resistente para cada antimicrobiano (EUCAST, 2018).

3. Estudio de supervivencia

Para evaluar la capacidad de supervivencia de las cepas de *A. baumannii* y *A. pittii* usadas en este estudio, se inocularon con ellas diferentes superficies sólidas estériles (supervivencia en desecación), así como solución salina estéril al 0,9% (p/v) (supervivencia en humedad con falta de nutrientes).

a. Preparación de inóculos

Las bacterias se cultivaron en 3 tubos de polipropileno de 50 ml (Thermo Fisher Scientific) por cepa, con 25 ml de medio Luria a 37°C en agitación a 200 rpm en un agitador orbital MaxQ™4000 (Thermo Fisher Scientific) durante 24 horas para conseguir un cultivo en fase estacionaria. Tras el periodo de incubación, se juntaron los cultivos de 2 de los tubos y se centrifugaron todos a 3220 g durante 10 minutos a 4°C. Una vez centrifugados, se eliminó el sobrenadante y se lavaron los *pellet* 2 veces con 30 ml de solución salina estéril al 0,9%, lo que permite observar las propiedades intrínsecas de las células sobre la tolerancia a la desecación, sin componentes del medio que puedan afectar a la supervivencia bacteriana en esas condiciones.

El *pellet* final de los tubos que originalmente contaban con 50 ml de cultivo se resuspendió en 6 ml de solución salina estéril; mientras que los inóculos iniciales de 25 ml se llevaron a un volumen final de 15 ml. El primero fue utilizado para los ensayos de desecación, mientras que el segundo se utilizó para los ensayos en humedad con falta de nutrientes.

b. Supervivencia en desecación

Se evaluó la capacidad de supervivencia de las cepas patógenas sobre diferentes superficies sólidas comunes en ambientes hospitalarios (cristal, plástico y bata blanca de algodón). Como superficie de cristal se emplearon cubreobjetos circulares de 15 mm de diámetro (1,76 cm²); como superficie de plástico el fondo del pocillo (1,9 cm²) de las placas de 24 pocillos (Corning™ Costar™, Thermo Fisher Scientific); y como bata blanca de personal sanitario o de laboratorio, fragmentos circulares de tejido de 1,5 cm² aproximadamente. Tanto los cubreobjetos como las porciones de tela fueron autoclavadas (121°C durante 20 min), mientras que las placas se adquirieron ya esterilizadas por el fabricante (radiación gamma).

- Preparación de placas

Para los ensayos de desecación se emplearon placas de 24 pocillos (Corning™ Costar™), en cuyo fondo se colocaron tanto los cubreobjetos como los fragmentos de bata estériles, como se muestra en el esquema (Figura 12).

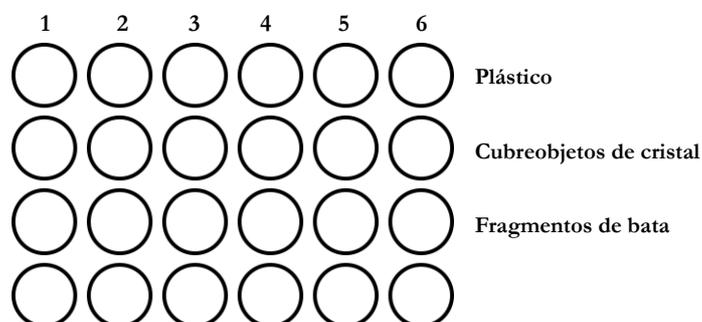


Figura 12: Esquema de placa de 24 pocillos. Las filas corresponden a diferentes superficies para ensayos de desecación y las columnas a las distintas cepas de estudio (1 a 6).

Cada superficie se inoculó con 50 μ l de las suspensiones bacterianas previamente preparadas en solución salina, con una densidad celular original de 10^7 células/ml ($5 \cdot 10^5$ bacterias/pocillo). Una vez inoculadas, las placas se mantuvieron abiertas en ambiente estéril (cabina de flujo laminar) hasta que se hubo eliminado toda la humedad.

Cuando los inóculos se secaron, las placas se almacenaron a temperatura ambiente (RT) y en oscuridad, midiendo diariamente la temperatura ($21,9 \pm 0,2^\circ\text{C}$) y humedad relativa ambiental ($54 \pm 1,6\%$). En la Figura 13 se muestra un ejemplo de placa inoculada seca, antes de ser almacenada.

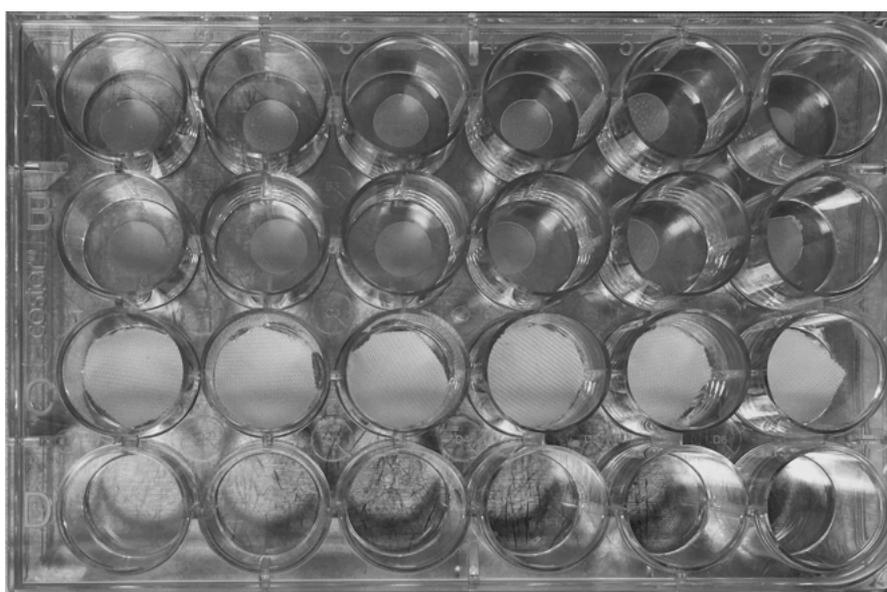


Figura 13: Placa inoculada y desecada en las diferentes superficies de análisis.

- Toma de muestras

Para el recuento de bacterias cultivables en condiciones de desecación, se resuspendieron los inóculos en solución salina al 0,9% y se realizaron diluciones seriadas en esa misma solución.

En el caso de cristal y plástico, se añadió 1 ml de solución salina para recuperar el mayor número posible de bacterias, despegándolas del fondo del pocillo con la ayuda de una punta de micropipeta de 200 μ l. Para recuperar las células de los fragmentos de tela, estos se colocaron en tubos de polipropileno de 15 ml (Thermo Fisher Scientific) conteniendo 5 ml de solución salina, y se agitaron intensamente con vórtex durante al menos 2 minutos.

Las muestras se tomaron en diferentes días y durante distinta longitud de tiempo en función de la especie bacteriana. En el caso de *A. baumannii* los días en los que se tomaron muestras fueron continuos al inicio y luego en intervalos de 10 días (días 0, 1, 3, 10, 20, 40, 50, 60), hasta un total de 60 días. Por otro lado, para *A. pittii* el periodo máximo fue de 43 días, reduciendo el tiempo entre muestras a una semana (días 0, 1, 2, 3, 8, 15, 22, 29, 36, 43).

Las muestras diluidas se inocularon en medio LA mediante *spots* de 10 μ l, o medio LA suplementado con piruvato sódico (LA+P) como medio de resucitación (1,0% [p/v] en el caso de *A. pittii* y 0,5% [p/v] para *A. baumannii*). Este último se utilizó para descartar la posibilidad de que las bacterias entraran en el estado viable no cultivable (VBNC por sus siglas en inglés *viable but not cultivable*). Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h para realizar el recuento de unidades formadoras de colonias (UFCs). En paralelo, las placas también se incubaron a RT para comprobar si la temperatura influía en su capacidad de recuperación y/o crecimiento.

Se realizaron 3 experimentos independientes en todos los casos, tanto para los diferentes medios y temperaturas de cultivo, como para cada toma de muestras.

- Curvas de supervivencia

Para realizar las curvas de supervivencia se empleó el software Microsoft® Excel para Mac (versión 16.16.2). Se tomó como referencia el número de UFCs a tiempo 0, y se estandarizó a 100%. De este modo, el resto de datos se expresaron en un porcentaje tomando como referencia las UFCs a tiempo 0 (inicial), siguiendo la fórmula que se muestra a continuación:

$$\% \text{ supervivencia} = \frac{\log_{10} \text{UFCs}_{\text{tiempo } t} \cdot 100}{\log_{10} \text{UFCs}_{\text{tiempo } 0}}$$

- **Mínimo inóculo recuperable**

De forma paralela, se realizó un ensayo para conocer el inóculo mínimo en UFCs que, en las condiciones testadas, era capaz de mostrar crecimiento y/o recuperación. Para ello, se partió de un cultivo en agitación O/N en 10 ml en medio Luria. Tras 24 h, se diluyó 100 veces (1:100) en solución salina 0,9% estéril, considerando esta suspensión bacteriana como dilución 0. Se realizaron diluciones seriadas en salino, y se inocularon placas de 96 pocillos de fondo en U (Sarstedt) con 1 μ l de cada cepa y dilución en cada pocillo. Las placas se dejaron secar toda la noche y se mantuvieron a RT y oscuridad durante 4 días, pasados los cuales se añadieron 200 μ l de medio Luria fresco. Se incubaron durante un máximo de 48 horas a 37°C y sin agitación, considerando crecimiento positivo la turbidez del medio. El inóculo inicial se cuantificó mediante recuento de UFCs.

c. **Supervivencia en humedad**

Paralelamente, se evaluó la capacidad de supervivencia de las cepas patógenas en condiciones de humedad pero expuestas a falta de nutrientes. Para ello, se mantuvieron las suspensiones bacterianas iniciales en 15 ml de solución salina en las mismas condiciones que las placas inoculadas, es decir, en oscuridad a RT y sin agitación.

- **Toma de muestras y curvas de supervivencia**

Para el recuento de bacterias cultivables en condiciones de falta de nutrientes, se realizaron diluciones seriadas en solución salina, partiendo de la suspensión bacteriana original como dilución 0. Las muestras se tomaron los mismos días que en el caso de la supervivencia en desecación, y se procedió de la misma manera.

Los datos para obtener las curvas de supervivencia se trataron del mismo modo que en el caso anterior.

d. **Capacidad de formación de *biofilms* o biocapas**

La capacidad de formación de *biofilms* de las células sometidas a estrés se valoró a largo del periodo de desecación y de falta de nutrientes. Para ello, se siguió el protocolo descrito por Remuzgo-Martínez y colaboradores (2015), en los diferentes puntos de muestreo. En cada pocillo se añadió 1 ml de medio Luria sobre cada una de las superficies

sólidas (plástico, cristal y tela) inoculadas con bacterias. Adicionalmente, en el mismo volumen se añadieron 5 μ l de las suspensiones celulares mantenidas en solución salina.

Los puntos de muestreo escogidos fueron los siguientes. En el caso de supervivencia en *A. baumannii*, se realizaron los ensayos los días 0, 20, 40 y 60; mientras que para *A. pittii* los días de elección fueron 0, 15, 36 y 43. Las placas con medio fresco se incubaron durante 48 h a 37°C, sin agitación. Los ensayos se realizaron por triplicado.

- **Capacidad de recuperación**

Para evaluar la capacidad y la velocidad de recuperación de las células a lo largo del periodo de desecación, tras añadir medio fresco sobre las superficies sólidas se tomaron muestras a intervalos regulares durante las 48 horas de incubación. Se realizaron diluciones seriadas en solución salina al 0,9%, del mismo modo que con las muestras de desecación. Se inocularon en placas con medio LA mediante *spots* de 10 μ l, y se incubaron durante 24 h a 37°C para hacer recuento de UFCs. La representación gráfica de las curvas de crecimiento se llevó a cabo mediante el software Microsoft® Excel para Mac (versión 16.16.2), representando en escala logarítmica la densidad celular en UFCs/ml vs el tiempo.

- **Tinción con cristal violeta (CV)**

Tras las 48 horas de incubación se eliminó el medio con las células planctónicas, y los fragmentos de tela en el caso de la bata. Para retirar las células no adheridas que no formaban parte del *biofilm*, los pocillos se lavaron tres veces con abundante agua destilada. Las células restantes que permanecieron adheridas se tiñeron con 1,5 ml de CV (0,7% [p/v] en agua) durante 12 min a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, el colorante se retiró y se volvieron a lavar los pocillos con agua destilada, para eliminar el compuesto sobrante.

Para solubilizar el CV, se empleó una solución de ácido acético al 33% ([v/v] en agua destilada), añadiendo 1,5 ml por pocillo e incubando las placas a RT en un agitador orbital (Grant Bio PMS-1000i) a 400 rpm durante un 1 min.

Una vez solubilizado el colorante, se tomaron muestras de 100 μ l por duplicado de cada pocillo, y se transfirieron a una placa de 96 pocillos de fondo plano, para determinar la densidad óptica a 620 nm en un lector de microplacas (Multiskan FC, Thermo Fisher Scientific). La cantidad de colorante expresado como DO₆₂₀, proporcional a la densidad de

células adherentes, se corrigió restando en cada caso el valor obtenido de la solubilización del cristal violeta en controles sin inocular.

- Normalización de biofilm

La lectura de la solubilización del CV se normalizó con la densidad celular para su representación. Para ello, se tomó el valor de UFCs/ml a las 48 h de cada pocillo convertida a escala logarítmica, y se normalizó la cantidad de *biofilm* formado, expresado como el cociente formado del valor del mismo (expresado como DO_{620}) entre el crecimiento bacteriano de cada cepa (expresado en \log_{10} UFCs/ml), tal y como se muestra en la siguiente fórmula:

$$\text{Biofilm normalizado} = \frac{DO_{620}}{\log_{10} \text{UFCs/ml}_{48 \text{ h}}}$$

Los ensayos para evaluar la capacidad de formación de *biofilm* se realizaron por triplicado en experimentos independientes.

e. Microscopía confocal

La viabilidad bacteriana durante los ensayos de supervivencia sobre los cubreobjetos se determinó empleando el kit de tinción *BacLight LIVE/DEAD*[®] (Molecular Probes Inc.).

Las bacterias se tiñeron añadiendo 100 μ l del colorante, previamente preparado en solución salina al 0,9% (1,5 μ l de SYTO 9 y 1,5 μ l de yoduro de propidio por cada ml), y se dejó actuar durante al menos 20 min en oscuridad y a RT. Se tomaron una serie de secciones ópticas mediante un microscopio confocal Nikon A1R, utilizando como longitudes de onda de excitación 488 nm (verde) y 561 nm (rojo), así como filtros de emisión de 500 a 550 nm y 570 a 620 nm, respectivamente. Se tomaron 3 imágenes elegidas al azar empleando un objetivo 40x Pan Apo (apertura numérica [NA] 0.75).

Las reconstrucciones de las secciones se ensamblaron usando el software NIS-Elements (versión 3.2). La herramienta de medida de volumen del software se empleó para reconocer la biomasa relativa (en porcentaje de píxeles) tanto de células vivas (fluorescencia verde) como de células muertas (fluorescencia roja). Con estos datos se pudo calcular el porcentaje de biomasa correspondiente a células vivas y muertas en todas las imágenes representativas del eje z.

f. Modelo animal de virulencia: *Galleria mellonella*

Se usó el último estadio larvario de la polilla de la cera *Galleria mellonella*, siguiendo las instrucciones de inoculación descritas por Kavanagh y Reeves (2004).

Las larvas de *G. mellonella* (BichoSA) se almacenaron a 4°C en oscuridad, usándose para los ensayos de virulencia durante los 3 días posteriores a su envío. Se emplearon ejemplares de un peso corporal de 250 ± 25 mg en todos los ensayos, con el objetivo de la estandarización de los resultados.

Se emplearon 2 cepas del patógeno *A. baumannii* escogidas en base a su comportamiento en los ensayos de supervivencia (HUMV 1319 y HUMV 2790) para evaluar su virulencia tras un estado de estrés prolongado. Por ello, se emplearon suspensiones bacterianas obtenidas de la supervivencia en humedad en solución salina, ajustando la densidad celular a $\sim 10^7$ UFCs/ml. Como control positivo de virulencia se empleó un inóculo fresco de esas mismas cepas y con la misma densidad celular. También se quiso probar la virulencia de las bacterias mantenidas en el tejido de la bata en desecación, pero no se alcanzó el número mínimo de bacterias necesarias para la dosis letal de estas bacterias.

Para inyectar alícuotas de 10 μ l de los distintos inóculos en el hemocele de cada larva a través del lado izquierdo del último segmento (previamente llevado a cabo por Peleg *et al.* (2009)) se empleó una jeringa Hamilton 10⁻¹. Se utilizaron 10 larvas por cada condición, véase: bacterias mantenidas en salino durante 60 días de las 2 cepas de *A. baumannii*, inóculo fresco de esas mismas cepas y solución salina 0,9% estéril como control de manipulación para ver el impacto del trauma físico. Adicionalmente, se añadieron 10 larvas sin manipular, como control de mortalidad natural. Se realizó recuento de UFCs en LA para confirmar el inóculo bacteriano, inyectando una cantidad final de 10⁵ bacterias/polilla.

Una vez inyectadas, cada grupo de 10 larvas se colocó en placas Petri de 9 cm con el fondo cubierto de papel Whatman de 8,5 cm de diámetro, para ser incubadas a 37°C en oscuridad. Las polillas fueron examinadas individualmente, para observar la melanización y el momento de muerte, cada 12 horas; considerándose muertas cuando no presentaron ningún movimiento como respuesta al contacto. Los ensayos se mantuvieron durante un máximo de 4 días, ya que en ese momento comienza el estadio de formación de pupa de estos insectos.

Los ensayos se realizaron por duplicado de manera independiente para cada cepa y condición, incluyendo los 2 grupos de control negativo también por duplicado (no infectadas -inyección con salino- y no manipuladas).

Las curvas de supervivencia se calcularon tomando como referencia las 10 larvas de cada condición, y normalizando ese valor inicial al 100%. Para su representación se empleó el software Prism 7 para Mac OS X (versión 7.0a).

g. Resistencia al suero humano

Todos los ensayos que involucraron muestras humanas se llevaron a cabo de acuerdo a los estándares internacionales de ética en la investigación y se aprobaron por el Comité Ético de Investigación Clínica de Cantabria (CEIC).

El suero humano se aisló de sangre venosa cedida por voluntarios sanos, después de aceptar el consentimiento informado. La sangre venosa se obtuvo y mantuvo aséptica permitiéndola coagular, para separar posteriormente el suero por centrifugación (805 *g* durante 15 min a 4°C). Se preparó un *pool* de sueros y se mantuvo a -20°C hasta su utilización.

Se sometió al suero a una inactivación del complemento por calor, manteniéndolo a 56°C durante 30 minutos (Kim *et al.*, 2009). Una vez inactivado, se prepararon 2 concentraciones finales (50 y 25%) en PBS, de suero normal e inactivado.

Se emplearon las 2 cepas de *A. baumannii* seleccionadas en el ensayo de virulencia en modelo animal, HUMV 1319 y HUMV 2790, para evaluar su capacidad de supervivencia en suero humano durante 3 horas. Para ello, se usaron las siguientes condiciones: bacterias mantenidas 60 días en desecación sobre bata de laboratorio, bacterias mantenidas durante 60 días en suspensión en solución salina, e inóculo fresco de las mismas cepas.

Se realizó recuento de UFCs a intervalos regulares (0, 30, 90 y 180 minutos) mediante diluciones seriadas inoculadas mediante *spots* de 10 μ l en medio LA. Las curvas de crecimiento se llevaron a cabo del mismo modo que en los ensayos de desecación, como se explica en el apartado 3.b. Se realizaron tres experimentos de manera independiente.

h. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se analizó la presencia y morfología de las bacterias inoculadas en los fragmentos de bata blanca de manera cualitativa a través de imágenes de microscopía electrónica de barrido.

Para ello, se procesaron los fragmentos de tela infectados con *A. baumannii* durante 1 hora o 60 días (junto con fragmentos de bata blanca sin inocular como control negativo), directamente sobre los pocillos de las placas, fijándose con glutaraldehído frío (Sigma Aldrich) al 3% durante 20 minutos a 4°C. Consecutivamente, las muestras se deshidrataron empleando una serie creciente de etanol (Panreac) preparada al 30%, 50%, 80%, 90% y 100% (v/v) en agua destilada. Cada muestra se incubó en cada concentración 10 min a RT; cortándose una vez deshidratadas en pequeños trozos. Posteriormente, se secaron las muestras para evaporar el etanol mediante el método de punto crítico; y se recubrieron con partículas de oro en un pulverizador de iones de capa fina JFC-1100 (JEOL) (pulverización catódica con partículas de oro). Una vez completado este proceso, las muestras se observaron en un microscopio electrónico de barrido Inspect S (FEI Company) operando a un voltaje de 15 kV o 20 kV, con distintos aumentos.

El secado por punto crítico, la pulverización con partículas de oro y las observaciones mediante SEM se realizaron en el Departamento de Anatomía y Biología Celular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria.

i. Análisis estadístico

Los datos se muestran como la media y desviaciones o errores estándares de las mismas, calculados en cada caso como se ha descrito en cada apartado. Para la comparación de los datos cuantitativos se aplicó el test *t*-Student de comparación de medias, del paquete estadístico del software Microsoft® Excel para Mac (versión 16.16.2). Se consideraron diferencias estadísticamente significativas los valores de *p* inferiores a 0,05 (*p* valor < 0,05).

4. Identificación de plásmidos

Para la identificación de plásmidos se emplearon técnicas de PFGE (electroforesis en campo pulsado), detección por PCR (con *primers* específicos) y análisis bioinformático, que se expondrá más adelante.

a. PFGE

Uno de los métodos que se emplearon para identificar la presencia de plásmidos, así como el tamaño de ellos si los hubiere, de las cepas de *A. baumannii* y *A. pittii* usadas en este estudio, fue un análisis de PFGE con la endonucleasa S1. Las soluciones y reactivos necesarios, así como el protocolo aplicado a las especies de estudio se detalla a continuación.

- Preparación de soluciones

Se emplearon varias soluciones tampón o buffer así como soluciones de lisis, que se muestran a continuación, en la Tabla 7.

| Componentes para TE | Cantidad para 1 L |
|---------------------|-------------------|
| Tris-HCl 1 M pH 8 | 10 ml |
| EDTA 0,5 M pH 8 | 2 ml |
| Agua MiliQ estéril | 988 ml |

| Componentes para ES | Cantidad para 250 ml |
|---------------------|----------------------|
| EDTA 0,5 M pH 8 | 250 ml |
| Sarcosil 1 % | 2,5 g |

| Componentes para buffer endonucleasa 1× | Cantidad para 125 µl |
|-----------------------------------------|----------------------|
| Stock 10× | 12,5 µl |
| Agua MiliQ estéril | 112,5 µl |

| Componentes para solución de lisis A | Cantidad para 1 ml |
|---------------------------------------------|---------------------------|
| Tris-HCl 1 M pH 8 | 6 μ l |
| NaCl 5 M | 200 μ l |
| EDTA 0,5 M pH 8 | 200 μ l |
| Desoxicolato-Na 10% | 20 μ l |
| Sarcosil 20% | 25 μ l |
| Brij 58 5% | 100 μ l |
| Lisozima 50 mg/ml | 10 μ l |
| Agua MiliQ estéril | 439 μ l |

| Componentes para solución de lisis B | Cantidad para 1 ml |
|---------------------------------------------|---------------------------|
| Proteinasa K 20 mg/ml | 25 μ l |
| Buffer ES | 975 μ l |

| Componentes para solución de restricción S1 | Cantidad para 20 U (125 μl) |
|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| Buffer endonucleasa 1 \times | 124,2 μ l |
| Enzima S1 180 U/ml | 0,8 μ l |

Tabla 7: Composición de tampones y soluciones empleadas en el PFGE.

- Procedimiento

Partiendo de cultivos O/N en agitación (175 rpm) en 10 ml de medio Luria, incubados a 37°C, se transfirió 1 ml de cada cultivo a microtubos de 2 ml estériles, y se centrifugaron durante 5 min a 12 000 rpm, con el fin de obtener un *pellet* celular. Tras retirar el sobrenadante, el *pellet* se lavó con 500 μ l de buffer TE 2 veces, centrifugando a la misma

velocidad durante 2 minutos. Los tubos con la suspensión bacteriana se mantuvieron a 50°C hasta su utilización. De forma paralela, se preparó la agarosa para bloques al 2% en TE (0,4 g en 20 ml), que se mantuvo también a 50°C una vez disuelta, misma temperatura que las suspensiones bacterianas. Se mezclaron 500 µl de suspensión bacteriana y de agarosa (a partes iguales) y se homogeneizaron completamente con la micropipeta. Una vez que se obtuvo una mezcla uniforme, se vertieron en los pocillos de los moldes para bloques, utilizando 2 para cada bacteria, manteniéndolos a 4°C hasta su solidificación. Una vez solidificados, los bloques se extrajeron de los moldes y se colocaron (juntos los dos tubos de cada cepa) en tubos Eppendorf de 2 ml que contenían 1 ml de solución de lisis A, previamente preparada (volumen final a preparar 1 ml por cada muestra +1). Los microtubos con los bloques y la solución de lisis A se incubaron O/N en agitación a 37°C (horizontalmente).

Pasado el tiempo de incubación, se eliminó la solución de lisis A y se lavaron los bloques con 1 ml de TE durante al menos 5 minutos a RT. Posteriormente, se retiró el buffer y se añadió 1 ml de la solución de lisis B (previamente preparada en mismo volumen que la solución de lisis A) a cada uno de los tubos, incubándolos durante 16-20 h a 56°C en estático.

Pasado el tiempo de incubación con la proteinasa K, se retiró completamente la solución y se añadió 1 ml de TE para lavar los bloques y eliminar los restos de los productos utilizados durante la lisis celular. Posteriormente, se transfirieron los bloques a tubos de 50 ml con 6 ml de TE precalentado a 50°C, donde se mantendrían en agitación a esa temperatura y se lavarían 5 veces, con ese mismo volumen cada 30 min.

Es necesario estabilizar los bloques como paso previo a la digestión enzimática, por lo que se incubaron con 125 µl del buffer de la endonucleasa 1× durante 15-20 minutos a 4°C. Solo es necesario 1/3 de uno de los bloques por cada cepa, por lo que el resto se almacenó a 4°C. Una vez finalizado el tiempo de estabilización, se retiró la solución de estabilización con la micropipeta y se añadieron 125 µl de la solución de restricción S1 y se dejó actuar, incubándose durante 30 minutos a 37°C que es la temperatura óptima de la enzima. De forma paralela, se preparó el gel con agarosa para PFGE al 1% en TBE al 0,5% (1,5 g en 150 ml) y se mantuvo a 50°C hasta su utilización. Una vez finalizada la digestión, se retiró la endonucleasa y se añadió 1 ml de TE para parar la reacción. Se introdujeron los bloques en los pocillos del gel con agarosa para PFGE, añadiendo un marcador de peso molecular (Lambda ladder PFGE marker, Biolabs), en el primero y el último, sellándolos con agarosa una vez introducidos para evitar que se muevan durante la electroforesis. El gel se

colocó sobre el sistema CHEF-DR® III previamente refrigerado a 14°C y llenado con 2 L de TBE 0,5×, y se dejó correr durante 22 h con las siguientes condiciones:

- Rango de pulsos: 1-15 segundos x 6 h
15-35 segundos x 16 h
- Tiempo: 22 horas
- Voltaje: 6 V/cm
- Ángulo: 120°

Una vez finalizada la electroforesis, el gel se tiñó con bromuro de etidio (1 µg/ml) durante 30 minutos para su visualización con transiluminador de luz UV.

b. PCR

Se emplearon los *primers* diseñados por Bertini (Bertini *et al.*, 2010) en su trabajo de caracterización de plásmidos de *A. baumannii*. Para ello, se obtuvo el ADN bacteriano con un protocolo de lisis celular, para lo que se obtuvieron cultivos puros de cada una de las cepas. La lisis se llevó a cabo en un Termociclador Mastercycler pro S (Eppendorf), donde 20 µl de la suspensión bacteriana se sometieron a un ciclo de 5 minutos a 72°C, seguido de un ciclo de 15 min a 95°C, para finalizarlo manteniendo la muestra a 4°C.

Una vez obtenido el ADN tras la fase de lisis celular que desintegra las membranas, se llevó a cabo la técnica de PCR en el mismo termociclador. Para ello, en primer lugar, se preparó el *mix* de la reacción en las proporciones que se indican a continuación: 10 µl buffer 5× (5×Green GoTaq® Flexi Buffer, Promega), 1 µl dNTPs 20 mM (dNTPs Polymerization Mix, GE Healthcare Life Sciences), 3 µl MgCl₂ 25 mM (Promega), 2 µl *primers* (invitrogen, Thermo Fisher Scientific) F-R (*f*orward y *r*everse) previamente alicuotados a concentración 10 µM, 1 µl Taq polimerasa (GoTaq® 5 U/µl, Promega) y 28 µl agua miliQ. Se emplearon 5 µl de la suspensión del ADN problema para llevar a cabo la reacción.

El protocolo de PCR se diseñó como se indica a continuación. Una fase de predesnaturalización de 2 min a 94°C; seguida de 30 ciclos de amplificación fragmentada en un paso de desnaturalización durante 15 segundos a 94°C, un paso de anillamiento específico a 55°C durante 15 s, y un paso de extensión durante 15 s a 72°C; para finalizar tras el último ciclo con un único paso de extensión a 72°C durante 1 min.

Los productos de PCR se mantuvieron a 4°C hasta su visualización en geles de agarosa. Para ello, se prepararon geles al 1% (p/v) agarosa en TBE 0,5× con 0,005% (v/v)

del reactivo RealSafe (REALSAFE 20.000×, Real Laboratory). Para la visualización, se cargaron 5 µl de cada producto por pocillo, añadiendo en cada caso como control negativo un producto de PCR al que se añadieron todos los *primers* pero con agua en lugar de ADN, y se corrieron los geles a 100 V durante 30 min.

5. Análisis genómico

Se llevó a cabo la secuenciación genómica de las distintas cepas utilizadas en este trabajo, con especial atención en la identificación de plásmidos y la búsqueda de determinantes de resistencia.

a. Extracción del ADN

Las muestras de genomas de las cepas analizadas en este trabajo se extrajeron y purificaron empleando un kit comercial de aislamiento de ADN, GeneJET genomic DNA purification kit (Thermo Fisher Scientific).

Se partió de cultivos O/N en 10 ml de medio Luria incubados en agitación a 37°C. Se tomaron 2 ml de dichas suspensiones y se centrifugaron durante 10 min a 5000 g. Una vez obtenido el *pellet* celular, se procedió de acuerdo a las instrucciones del fabricante, eluyendo la columna final en un máximo de 100 µl del búfer proporcionado en el kit.

Tanto la cantidad como la pureza del ADN extraído se midieron mediante espectrofotometría a 260 nm, empleando el ratio A_{260}/A_{280} , en el espectrofotómetro para cuantificación de ácidos nucleicos NanoDrop™ 1000c (Thermo Fisher Scientific). Del mismo modo, la presencia y la homogeneidad del producto de purificación se evaluaron mediante electroforesis (100 V durante 30 min) en geles de agarosa (Low EEO, Sigma) al 1% (p/v), preparados en TBE 0,5× (Fisher BioReagents, Fisher Scientific). El ADN purificado se mantuvo refrigerado a -20°C, hasta su envío para secuenciación.

b. Secuenciación

Se llevó a cabo la secuenciación genómica de las cepas del presente trabajo, a través de 2 técnicas (PacBio e Illumina), para lo que se contactó con 2 empresas externas diferentes.

- PacBio single-molecule real-time (SMRT)

Mediante la técnica de secuenciación PacBio SMRT, se secuenciaron la mayoría de los genomas de las cepas de *A. pittii*. Para ello, se envió un mínimo de 10 µg de ADN de cada una de las muestras al servicio de secuenciación de la empresa Macrogen (Seúl, Korea del Sur).

Se creó una librería individual para cada una de las cepas enviadas a Macrogen, que posteriormente se prolongaron en una célula SMRT. Las lecturas iniciales resultantes de cada

secuenciación fueron introducidas para su ensamblaje en HGAP3 (Hierarchical Genome Assembly Process versión 3), obteniendo una cobertura de secuenciación final de casi el 100% del genoma problema.

- **Illumina**

Mediante la técnica Illumina MiSeq (2x300), se secuenciaron los genomas de todas las cepas *A. baumannii*, así como las de *A. pittii* secuenciadas mediante PacBio SMRT. Para ello, se envió un mínimo de 5 ng/ μ l de ADN en volumen final de 10 μ l al servicio de secuenciación de la empresa FISABIO (Valencia, España). Se generaron pares de secuencias complementarias para cada una de las cepas enviadas, así como productos no complementarios.

c. **Análisis bioinformático**

- **Python: anaconda 4.40**

Para la integración de programas y herramientas se empleó la plataforma Anaconda, que forma parte del gestor de paquetes Conda, complementado por el proyecto *conda-forge* (<https://conda-forge.github.io>), a través del entorno de lenguaje Python; así como otros programas que resultaron necesarios y fueron compatibles (Grüning *et al.*, 2018).

Línea de comandos ejecutados para la instalación:

```
$ conda config --add channels r
$ conda config --add channels conda-forge
$ conda config --add channels bioconda
$ conda config --add channels etetoolkit
$ conda create -c defaults -n bio3-env python=3 jupyter biopython reportlab
brewer2mpl pydna bcbiogff
```

- **Ensamblaje: Unicycler**

La secuenciación mediante la técnica de Illumina produjo 4 conjuntos de lecturas cortas (*short reads*) para cada una de las cepas, 2 que corresponden a la secuenciación complementaria en los dos sentidos de lectura (denominados *CEPA_1.fastq.gz* y *CEPA_2.fastq.gz*) y otros 2 archivos de las secuencias que no obtuvieron producto complementario al secuenciar en la dirección opuesta (denominados *CEPA_U1.fastq.gz* y *CEPA_U2.fastq.gz*). Para obtener un solo conjunto de *contigs* por cada una de las cepas analizadas, se empleó el programa *unicycler*, para realizar el ensamblaje de los mismos.

Se empleó esta herramienta porque produce menor número de falta de ensamblajes que otros programas, que a menudo producen mayores tasas de error (Wick *et al.*, 2017).

Línea de comando ejecutado para la instalación:

```
$ conda create -c bioconda -c conda-forge -c defaults -n unicycler unicycler
```

Línea de comandos desarrollados para la ejecución del programa:

```
$ unicycler -1 CEPA_1.fastq.gz -2 CEPA_2.fastq.gz -o CEPA
$ unicycler -1 CEPA_1.fastq.gz -2 CEPA_2.fastq.gz -s CEPA_U1.fastq.gz -s
  CEPA_U2.fastq.gz -o CEPA
```

El programa ofrece la opción de incluir aquellas lecturas que no han obtenido secuencia complementaria para que el ensamblaje sea más completo, en cuyo caso se ejecutaría la segunda línea de comandos mostrada. Una vez que el ensamblaje concluyó, se creó una carpeta (CEPA) con los siguientes archivos, para cada uno de los genomas analizados, siendo el archivo `assembly.fasta` la base de trabajo posterior:

```
001_unbridged_graph.gfa
002_spades_bridges_applied.gfa
003_final_clean.gfa
004_polished.gfa
assembly.fasta
assembly.gfa
```

- Anotación

Debido al creciente número de genomas microbianos secuenciados gracias a la tecnología NGS, la necesidad de un sistema rápido y eficaz de anotación ha llevado al desarrollo de programas de anotación genómica completamente automáticos. La anotación de genoma es el proceso de identificar y clasificar todas las características relevantes en una secuencia genómica (Richardson y Watson, 2012).

o RAST

Dado que RAST es un servidor online, es necesario subir el archivo en formato fasta (`assembly.fasta`), y se obtendrá inmediatamente un resumen de características (tamaño de secuencia, número de contigs, contenido GC, entre otros). Una vez que el servidor ha cargado el fichero, dentro de las características que ofrece y dentro de la información genómica, es necesario escoger el dominio del organismo secuenciado (*Bacteria*), y el código genético (11 (*Archaea, most Bacteria, most Virii, and some Mitochondria*)).

Una vez que finaliza el proceso de anotación y análisis, el programa permite la descarga de una serie de archivos que contienen distinta información sobre el genoma que se ha agregado: *Amino-Acid FASTA file* con la secuencia de aminoácidos; *EMBL* con la secuencia traducida en aminoácidos de los genes identificados con dicha base de datos; *GenBank* con los genes identificados en la secuencia correspondiente (archivo **.gbk*); *Nucleic-Acid FASTA file* con la secuencia de nucleótidos; *Spreadsheet*, una tabla con los datos de cada gen identificado y su secuencia; entre otros.

Además, se puede acceder a las opciones en el visor SEED (*Browse annotated genome in SEED Viewer*) en el que la plataforma muestra la organización y características de los subsistemas; información que también puede ser descargada (*features_RAST.tsv*).

○ Prokka

La ejecución de Prokka, como indica la línea de comando descrita posteriormente, emplea como archivo de base el fichero *assembly.fasta* obtenido en el paso de ensamblaje, generando a su vez una serie de archivos a los que asigna el nombre que se indique al ejecutarlo (CEPA), entre los que destacan: *CEPA.faa* (archivo FASTA con traducción a aminoácidos de genes codificantes), *CEPA.gbk* (archivo Genbank con anotaciones y secuencias de cada una), *CEPA.tsv* (archivo con tabla resumen de todas las características y funciones de la anotación), *CEPA.txt* (archivo con resumen de estadística de anotación). Asimismo, cuenta con la opción de la ejecución del comando *abricate*, que genera un archivo *CEPA.csv*, en el que figura un listado resumen de los genes de resistencia del genoma analizado.

Línea de comando ejecutado para la instalación:

```
$ conda create -n prok-env -c bioconda -c conda-forge prokka spades abricate
```

Línea de comandos desarrollados para la ejecución del programa:

```
$ prokka --outdir Carpeta_CEPA --prefix CEPA assembly.fasta  
$ abricate --outdir Carpeta_CEPA --prefix CEPA assembly.fasta
```

De forma predeterminada, *abricate* utiliza como base de datos “*resfinder*”. De modo que, para utilizar otra base que integra toda la información del resistoma, se utilizó la base de datos “*card*”, como se indica en la línea de comando a continuación:

```
$ abricate --db card assembly.fasta
```

- **CARD**

Como en el caso de RAST, es necesario subir el archivo de la secuencia FASTA para que establezca las similitudes e identifique los posibles determinantes de resistencia del genoma de análisis. Para lo cual, es necesario seleccionar la opción *Browse* y la base de datos *RGI*, donde es necesario subir el archivo en formato fasta (**assembly.fasta**).

Una vez que ha finalizado la búsqueda de determinantes de resistencia, el programa proporciona la información sobre los genes que ha identificado, el criterio de detección que ha empleado, las clases de antibióticos a los que está descrito que proporciona resistencia, el tipo de mecanismo de resistencia (bomba de expulsión, modificación de diana, inactivación enzimática) y la identidad del alineamiento (en %). Además, proporciona esta información en forma de gráfico en la que señala la calidad de los alineamientos e identificaciones.

La plataforma permite la descarga de esta información, así como la secuencia de cada uno de los genes que ha identificado.

- **ISfinder**

ISfinder también es una base de datos online, con las diferentes opciones de BLAST, es decir, realiza comparativa de secuencia de aminoácidos y de nucleótidos. Se empleó la opción de nucleótidos (*blastn*) para lo que se subió el archivo fasta (**assembly.fasta**) dentro de la opción *Blast* en *Tools*.

Una vez finaliza la comparativa y establece los alineamientos por pares, la plataforma brinda un listado de coincidencias de mayor a menor significancia. Dicha concordancia viene determinada por el parámetro *E value*, cuanto más bajo (cerca de cero) es, más exacta es la identificación de la secuencia de inserción.

- **Comparación**

Se realizaron distintos análisis complementarios que permiten la comparación de diferentes características de los genomas bacterianos, desde su relación taxonómica a la separación de genes ortólogos e identificación de plásmidos.

- **ANI**

Se empleó el calculador de matriz basada en distancia genómica (ANI/AAI-Matrix) desarrollado por Kostas Lab (<http://enve-omics.ce.gatech.edu/ani/>) para calcular los

valores ANI en formato matriz que permite diferenciar los genomas que pertenecen a la misma especie (punto de corte $\geq 95\%$) o género ($\geq 80\%$). Como es una plataforma en línea, es necesario subir los genomas a comparar en formato `*.fasta`.

- **DDH**

Para el cálculo de valores DDH se empleó el calculador online de distancia entre genomas 2.1 (GGDG) (<http://ggdc.dsmz.de/ggdc.php/>). Esta opción solo permite la comparación de 2 genomas entre ellos, identificados como genoma de consulta y de referencia. En este caso el punto de corte que determina que una cepa es perteneciente a una especie es más amplio ($>70\%$), llegando a diferenciar la inclusión en subespecie ($>79\%$).

- **Pan-genoma**

El análisis del pan-genoma se simplifica cuando ortólogos pueden ser determinados y separados de los parálogos. PanOCT utiliza información génica conservada para separar parálogos que han divergido recientemente en clúster de ortólogos (Fouts *et al.*, 2012), algo que otros métodos de agrupación por homología no son capaces de hacer.

Este programa puede actualmente crear grupos de ortólogos que contienen como mucho una proteína de cada genoma. Para proteínas altamente similares, que en algunos casos podrían ser co-ortólogos, PanOCT utiliza la información génica conservada para decidir cuál se incluye en el grupo, con la intención de agrupar proteínas que es más probable que sean funcionalmente equivalentes. De manera complementaria, este programa permite la comparación visual de los cromosomas bacterianos en una representación circular de los mismos, en los que además de observarse la homología en ambas cadenas (*forward* y *reverse*), resalta las secuencias que corresponden a ARNt y ARNr.

La utilización de este programa requiere de la descarga e instalación previa de la base de datos eggNOG (http://eggnogdb.embl.de/download/eggnog_4.5/ y https://eggnogdb.embl.de/download/eggnog_4.5/data/bactNOG/); que genera los archivos `bactNOG.members.tsv.gz`, `bactNOG.annotations.tsv.gz` y `eggnog4.proteins.core_periphery.fa`.

Línea de comando:

```
$ makeblastdb -dbtype prot -in eggnog4.proteins.core_periphery.fa -out eggNOGcpDB
$ blastp -db eggNOGcpDB -query CEPA_RAST.faa -out CEPA.blast.tsv -evalue .01 -
max_hsps 1 -outfmt 6 -num_alignments 1 -num_threads 8
```

```

$ fix_rast_gb.py CEPA_RAST.gbk - -l STRAIN | restore_gb_metadata.py CEPA_RAST.gbk
- CEPA.fixed.gbk
$ annotate_eggnog.py CEPA.fixed.gbk CEPA.blast.tsv - -a bactNOG.annotations.tsv -
m bactNOG.members.tsv -av CEPA_eggnog_avail.tsv -p CEPA_eggnog_proc.tsv -s CEPA |
restore_gb_metadata.py CEPA.fixed.gbk - CEPA.eggnog.gbk
$ annotate_rast.py CEPA.eggnog.gbk CEPA.fixed.gbk CEPA_features_RAST.tsv - -av
CEPA_RAST_avail.tsv -p CEPA_RAST_proc.tsv -s CEPA | restore_gb_metadata.py
CEPA.eggnog.gbk - CEPA_final.gbk
$ generate_auxiliary_genome_files.py CEPA_final.gbk

```

Reunir todos los archivos `CEPA_final.gbk` en una carpeta (`CARPETA_ESPECIE`)

```

$ generate_panocct_input_files.py CEPA CARPETA_ESPECIE
$ makeblastdb -dbtype prot -parse_seqids -in CEPAS.faa -out ESPECIE_DB
$ blastp -db SPECIE_DB -query CEPAS.faa -outfmt 6 -out ESPECIE.blast.tsv -
num_threads 8
$ panocct.pl -t ESPECIE.blast.tsv -f ESPECIE.tags.txt -g ESPECIE.gene_att -P
CEPAS.faa -S Y -L 1 -M Y -H Y -V Y -N Y -F 1.33 -G y -c 0,25,50,75,100 -T
$ summarize_ortholog_clusters.py matchtable.txt CEPA_ortholog.tsv -t
ESPECIE.tags.txt
$ orthologs_identity_plot.py panOCT/id.txt panOCT/ESPECIE.tags.txt
panOCT/especie/CEPA_REFERENCIA.gbk ESPECIE_CEPA_REFERENCIA

```

Una vez finalizado el análisis comparativo de las cepas y/o especies, se empleó el programa PanGP para completar el análisis del perfil del pan-genoma y el genoma core del conjunto de estudio. Para ello se empleó la línea de comando que figura a continuación, para obtener el archivo `ESPECIE.txt`, formato necesario para ejecutar la opción *Gene Cluster File* del programa de escritorio, que genera una gráfica comparativa entre el número de genomas y los tamaños del pan-genoma y genoma core.

```

$ convert_panocct_to_pangp.py matchtable.txt ESPECIES.tags.txt ESPECIE.txt

```

○ BRIG

El programa BRIG es una herramienta que permite la comparación visual de genomas bacterianos entre ellos (misma especie o género). Para ello, se selecciona una cepa de referencia cuyo genoma esté cerrado, empleando en este caso los archivos obtenidos de la anotación en formato `*.gbk`. Se incluyeron, además, las cepas de referencia de *A. baumannii* y *A. pittii* AYE y PHEA-2, respectivamente, publicadas en la base de datos GenBank.

- **MEGA: árboles y mapeo de mutaciones**

Se empleó el programa MEGA (*Molecular Evolutionary Genetic Analysis*) (versión MEGA7) para la elaboración de árboles filogenéticos y mapeo de mutaciones puntuales en genes de interés.

Para elaborar los árboles, se empleó el método Maximum Likelihood con los genes para ARNr 16S que está basado en el modelo Tamura-Nei, en el que los nexos (bootstraps) del árbol consenso, que representan la historia evolutiva de las cepas, se obtienen de la evaluación de 500 réplicas (Kumar *et al.*, 2016). Junto a cada punto de ramificación se muestra una cifra que corresponde al porcentaje de árboles en los que se produce esa asociación. El árbol inicial para la búsqueda heurística se obtiene automáticamente aplicando los algoritmos Neighbor-Join y BioNJ a una matriz de distancias por pares estimadas usando la aproximación Maximum Composite Likelihood (MCL) y seleccionando la topología con mayor valor.

- **PLACNET**

Se empleó el software PLACNET para identificar la presencia de plásmidos, así como su tamaño aproximado y la presencia de determinadas características en ellos, en los genomas secuenciados mediante la técnica Illumina. Para ello, debido a que es una herramienta en línea (<https://castillo.dicom.unican.es/upload/>), se subieron los dos archivos de cada cepa, correspondientes a las secuenciación Illumina (*forward* y *reverse*) y se realizó un filtrado posterior eliminando todos aquellos *contigs* cuya longitud fuera igual o inferior a las 200 pares de bases.

6. Estabilidad de plásmidos

Para evaluar la estabilidad de plásmidos, se llevaron a cabo ensayos adaptando el protocolo de De Gelder y colaboradores (2007). Para ello se partió de una colonia aislada de cada cepa y se resuspendió en 10 ml de medio Luria. Los cultivos se mantuvieron en agitación (175 rpm) en un agitador orbital a 37°C, pasando cada 24 h 10 μ l del cultivo saturado a 10 ml de medio fresco, en una dilución 1:1000.

Cada 24 horas, el cultivo saturado se sembró (tras realizar diluciones seriadas en solución salina) en medio LA para obtener colonias aisladas sobre las que evaluar la presencia del plásmido. Por cada cepa y cada tiempo se escogieron 10 colonias al azar, para llevar a cabo la técnica de PCR con la que se evaluó la presencia del plásmido, como se indica más adelante. Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

a. Tiempo de generación

El cálculo del tiempo de generación se hizo a través de la constante de crecimiento, de acuerdo a Prescott *et al.* (1999).

$$\mu = \frac{n}{t}$$

$$\mu = \frac{1}{g}$$

$$g = \frac{t}{n}$$

b. PCR

Las colonias independientes se sometieron a un protocolo de lisis por calor para desintegrar las membranas. Para ello, cada colonia de cultivo puro se resuspendió en 20 μ l de agua MiliQ estéril, con ayuda de la punta de una micropipeta, en un microtubo de 200 μ l para PCR (VWR International). El protocolo de lisis se llevó a cabo en un Termociclador Mastercycler pro S (Eppendorf) del siguiente modo: un ciclo de 5 minutos a 72°C, seguido de un ciclo de 15 min a 95°C, para finalizarlo manteniendo la muestra a 4°C.

- Primers

Se emplearon los *primers* diseñados por Bertini y colaboradores (2010) en un estudio en el que distribuyeron los plásmidos del género *Acinetobacter* en grupos en base a las proteínas

de replicación que poseen. Previa a su utilización, se realizó un alineamiento BLAST para identificar si las cepas del estudio poseían dichos plásmidos y en caso afirmativo a qué grupo pertenecía. La secuencia de los *primers*, así como el grupo plasmídico al que pertenecen y las cepas que los poseen se muestran a continuación en la Tabla 8.

| Grupo plásmido | Secuencia <i>primers</i> 5'-3' | Cepa(s) |
|----------------|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| <i>gr8</i> | F, AATTAATCGTAAAGGATAATGC R, GACATAGCGATCAAATAAGC | ATCC 19606 |
| <i>gr2</i> | F, AGTAGAACAACGTTTAATTTTATTGGC R, CCACTTTTTTATAGGTATGGGTATAG | HUMV 1319 HUMV 2471 HUMV 2790 |
| <i>gr6</i> | F, AGCAAGTACGTGGGACTAAT R, AAGCAATGAAACAGGCTAAT | HUMV 3743 |
| <i>gr3</i> | F, TAATTAATGCCAGTTATAACCTTG R, GTATCGAGTACACCTATTTTIGT | HUMV 0315 |

Tabla 8: Relación de *primers* utilizados correspondientes a cada grupo plasmídico y las cepas de estudio en las que se encuentran

- Condiciones

Una vez obtenido el ADN tras la fase de lisis celular se llevó a cabo la técnica de PCR en el mismo termociclador.

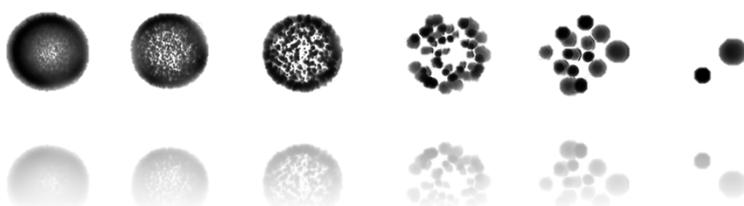
Para ello, en primer lugar, se preparó el *mix* de la reacción en las proporciones que se indican a continuación: 10 μ l buffer 5 \times (5 \times Green GoTaq[®] Flexi Buffer, Promega), 1 μ l dNTPs 20 mM (dNTPs Polymerization Mix, GE Healthcare Life Sciences), 3 μ l MgCl₂ 25 mM (Promega), 2 μ l *primers* (invitrogen, Thermo Fisher Scientific) F-R (*f*orward y *r*everse) previamente alicuotados a 10 μ M, 1 μ l Taq polimerasa (GoTaq[®] 5 U/ μ l, Promega) y 28 μ l agua miliQ. Se emplearon 5 μ l de la suspensión del ADN problema para llevar a cabo la reacción.

El protocolo de PCR se diseñó como se indica a continuación. Una fase de predesnaturalización de 2 min a 94°C; seguida de 30 ciclos de amplificación fragmentada en un

paso de desnaturalización durante 15 segundos a 94°C, un paso de anillamiento específico a 55°C durante 15 s, y un paso de extensión durante 15 s a 72°C; para finalizar tras el último ciclo con un único paso de extensión a 72°C durante 1 min.

Los productos de PCR se mantuvieron a 4°C hasta su visualización en geles de agarosa. Para ello, se prepararon geles al 1% (p/v) agarosa en TBE 0,5× con 0,005% (v/v) del reactivo RealSafe (REALSAFE 20.000×, Real Laboratory). Para la visualización, se cargaron 5 µl de cada producto por pocillo, añadiendo en cada caso como control negativo un producto de PCR al que se añadieron todos los *primers* pero con agua en lugar de ADN, y se corrieron los geles a 100 V durante 30 min.

RESULTADOS



1. Curvas de crecimiento

En primer lugar, se realizaron curvas de crecimiento para confirmar que las cepas de ambas especies incluidas en este trabajo crecen a una velocidad similar, pudiendo así descartar las posibles diferencias que se encuentren como consecuencia de las variaciones entre cepas.

En la Figura 14, se muestran las curvas de crecimiento de las 5 cepas de *A. baumannii* durante las 24 h de incubación, representada como medida de la densidad óptica del cultivo a 600 nm.

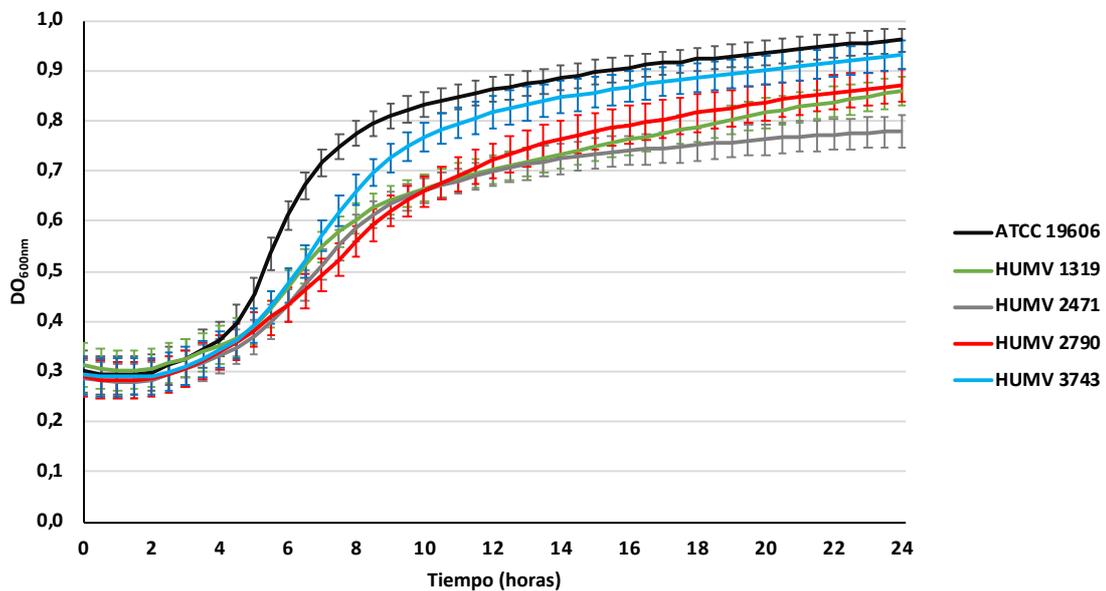


Figura 14: Curvas de crecimiento de *A. baumannii*. Cada punto muestra la media de 4 réplicas independientes y las barras de error la desviación estándar (\pm SD). La leyenda recoge el nombre de las cepas utilizadas.

La Figura 15 muestra las curvas de las 6 cepas de *A. pittii*, en las mismas condiciones que en el caso anterior.

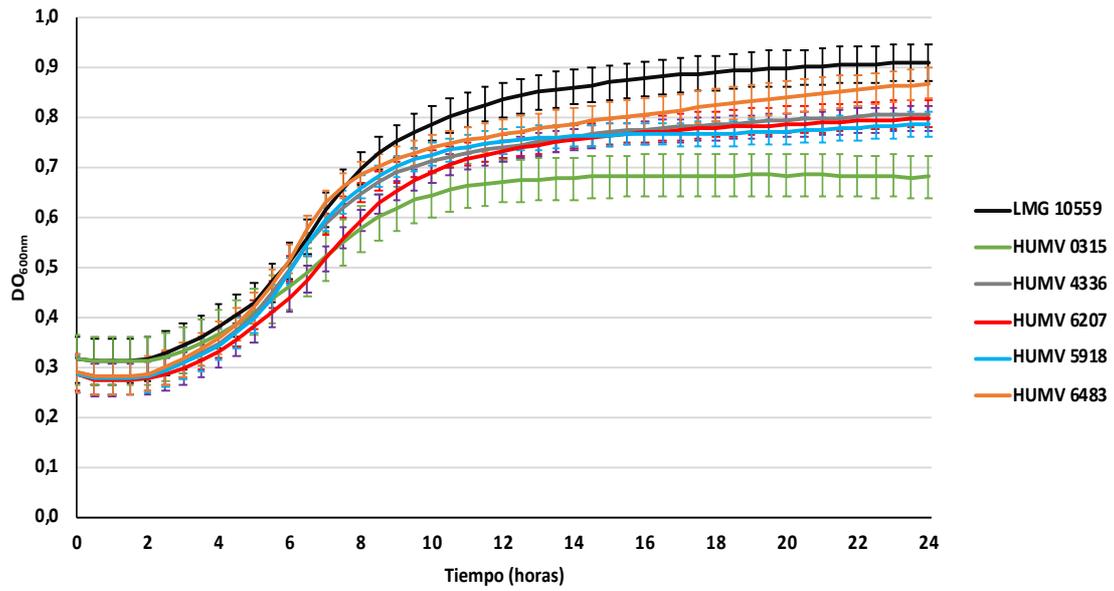


Figura 15: Curvas de crecimiento de *A. pittii*. Cada punto muestra la media de 4 réplicas independientes y las barras de error la desviación estándar ($\pm SD$). La leyenda recoge el nombre de las cepas utilizadas.

2. Determinación de concentraciones mínimas inhibitorias

Para determinar la sensibilidad a los distintos antibióticos de las cepas utilizadas, se empleó la técnica de microdilución en medio MH, aplicando para ello los puntos de corte definidos por EUCAST para el género *Acinetobacter*, recogidos en la Tabla 9. Cada valor de CMI se estableció tras 3 experimentos independientes, escogiendo la concentración mayor en caso de que hubiera diferencia entre ellos, siendo esta diferencia como máximo de una dilución (Figura 16).

| | COL | MER | AMP* | GEN | CIP | TET** | ERI |
|-------------------|-----|-----|------|-----|-----|-------|-----|
| Sensible | ≤2 | ≤2 | ≤2 | ≤4 | ≤1 | ≤4 | - |
| Resistente | >2 | >8 | >8 | >4 | >1 | ≥16 | - |

Tabla 9: Puntos de corte de diferentes antibióticos (mg/L) para *Acinetobacter* spp. definidos por EUCAST.

COL: colistina; MER: meropenem; AMP: ampicilina; GEN: gentamicina; CIP: ciprofloxacino; TET: tetraciclina; ERI: eritromicina.

* Punto de corte no definido para *Acinetobacter*, por lo que valor general para especies sin punto definido.

** Empleados puntos de corte CLSI por carencia de datos en EUCAST.

- Punto de corte no definido.

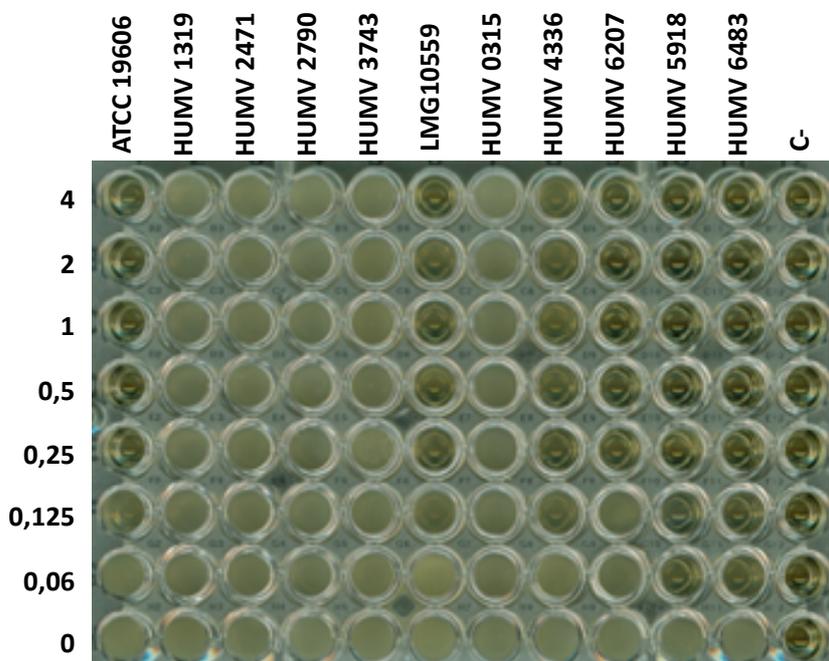


Figura 16: Placa inoculada para lectura de microdilución. Se consideró positivo en el cultivo cuando existía turbidez. De arriba abajo, concentración decreciente de antibiótico ciprofloxacino (µg/ml) y control positivo sin antibiótico (0). De izquierda a derecha colección de cepas de *Acinetobacter* usadas y control negativo con mismas concentraciones de antibiótico pero sin inóculo bacteriano.

- *Acinetobacter baumannii*

La Tabla 10 muestra las CMI_s de cada cepa de *A. baumannii* para cada antibiótico, junto con los perfiles de resistencia que muestra cada una. Se obtuvieron 3 perfiles de resistencia diferentes, siendo la cepa de colección (ATCC 19606) la que presentaba sensibilidad a un mayor número de antibióticos; mientras que dos de ellas (HUMV 2790 y HUMV 3743) resultaron resistentes a todos los antibióticos analizados.

| | COL | MER | AMP | GEN | CIP | TET | ERI | Perfiles resistencia |
|-----------------------|-----|-----|-----|------|-------|-----|------|-------------------------|
| ATCC 19606 | 8 | 4 | >64 | 4 | >0,25 | 1 | >128 | CMAE |
| HUMV 1319 | 2 | >16 | >64 | >128 | >4 | 8 | >128 | MAGPTE |
| HUMV 2471 | 2 | >16 | >64 | >128 | >4 | 16 | 32 | MAGPTE |
| HUMV 2790 | 8 | 4 | >64 | 8 | >4 | >32 | >128 | CMAGPTE |
| HUMV 3743 | 4 | >16 | >64 | >128 | >4 | >32 | 64 | CMAGPTE |

Tabla 10: Relación de CMI_s (mg/L) de cada cepa de *A. baumannii* para cada antibiótico, junto con los perfiles de resistencia para cada una de ellas.

COL: colistina; MER: meropenem; AMP: ampicilina; GEN: gentamicina; CIP: ciprofloxacino; TET: tetraciclina; ERI: eritromicina.

C: colistina; M: meropenem; A: ampicilina; G: gentamicina; P: ciprofloxacino; T: tetraciclina; E: eritromicina.

Asimismo, la Tabla 11 recoge las CMI₅₀ y CMI₉₀, que corresponden a la concentración mínima inhibitoria para 50 o 90% de las cepas respectivamente, calculadas en base a los resultados de la tabla anterior. Cabe destacar que, para los 7 antibióticos analizados, la CMI₅₀ es superior al punto de corte que define a una cepa como resistente, poniendo de manifiesto el alto nivel de resistencia de este conjunto.

| | COL | MER | AMP | GEN | CIP | TET | ERI |
|-------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| CMI₅₀ | 4 | >16 | >64 | >32 | >4 | 16 | >128 |
| CMI₉₀ | >8 | >16 | >64 | >32 | >4 | >32 | >128 |

Tabla 11: Relación de CMI₅₀ y CMI₉₀ para el conjunto de las cepas de *A. baumannii* utilizadas.

COL: colistina; MER: meropenem; AMP: ampicilina; GEN: gentamicina; CIP: ciprofloxacino; TET: tetraciclina; ERI: eritromicina.

- *Acinetobacter pittii*

Del mismo modo, la Tabla 12 muestra las CMI de cada cepa de *A. pittii* para cada uno de los 7 antibióticos, junto con sus perfiles de resistencia. En este caso también se obtuvieron 3 perfiles de resistencia diferentes, siendo el fenotipo de resistencia simultánea a colistina, ampicilina y eritromicina el más abundante. La cepa que presentó más resistencias fue la cepa clínica HUMV 0315, sensible solo a gentamicina y tetraciclina. Todas las cepas fueron resistentes al antibiótico de último recurso colistina.

| | COL | MER | AMP | GEN | CIP | TET | ERI | Perfiles resistencia |
|------------------|-----|-----|-----|-----|--------|------|------|----------------------|
| LMG 10559 | 8 | 2 | >64 | 4 | >0,25 | 1 | >128 | CAE |
| HUMV 0315 | 4 | >16 | >64 | 4 | >4 | 1 | 64 | CMAPE |
| HUMV 4336 | 8 | 2 | >64 | 2 | >0,125 | 1 | >128 | CAE |
| HUMV 6207 | 4 | 2 | >64 | 16 | >0,25 | <0,5 | 64 | CAGE |
| HUMV 5918 | 8 | 2 | >64 | 1 | <0,06 | 1 | 64 | CAE |
| HUMV 6483 | 8 | 2 | >64 | 2 | <0,06 | 1 | 64 | CAE |

Tabla 12: Relación de CMI (mg/L) de cada cepa de *A. pittii* para cada antibiótico, junto con los perfiles de resistencia para cada una de ellas.

COL: colistina; MER: meropenem; AMP: ampicilina; GEN: gentamicina; CIP: ciprofloxacino; TET: tetraciclina; ERI: eritromicina.

C: colistina; M: meropenem; A: ampicilina; G: gentamicina; P: ciprofloxacino; T: tetraciclina; E: eritromicina.

La Tabla 13 muestra las CMI_{50} y CMI_{90} para el conjunto de las 6 cepas de *A. pittii*. Si bien en este caso los valores de CMI_{50} son en su mayoría más bajos que en el caso de *A. baumannii*, los valores en su conjunto revelan un alto nivel de fenotipos resistentes.

| | COL | MER | AMP | GEN | CIP | TET | ERI |
|------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| CMI_{50} | >8 | 2 | >64 | 2 | 0,125 | 1 | 64 |
| CMI_{90} | >8 | >16 | >64 | 16 | >4 | 1 | >128 |

Tabla 13: Relación de CMI_{50} y CMI_{90} para el conjunto de las cepas de *A. pittii* utilizadas.

COL: colistina; MER: meropenem; AMP: ampicilina; GEN: gentamicina; CIP: ciprofloxacino; TET: tetraciclina; ERI: eritromicina.

3. Estudio de supervivencia

Partiendo de las mismas condiciones de cultivo e inoculación, tanto en *A. baumannii* como en *A. pittii*, se evaluaron diferentes comportamientos de las cepas (supervivencia, capacidad de adherencia, virulencia) a lo largo del tiempo en que estuvieron sometidas a condiciones desfavorables.

a. Supervivencia en desecación y privación de nutrientes

Con el fin de analizar la capacidad de supervivencia de las bacterias bajo condiciones desfavorables de desecación sobre superficies abióticas similares a las hospitalarias (plástico, cristal, bata) y de privación de nutrientes en solución salina, se realizaron curvas de supervivencia con las bacterias recuperadas tras semanas en esas condiciones.

i. Efecto de la temperatura

Ya que las bacterias se mantuvieron a temperatura ambiente durante el periodo de desecación o privación de nutrientes, lo primero que se evaluó fue el efecto de la temperatura durante el periodo de incubación una vez recolectadas y sembradas en medio LA y LA+P. Para ello, se seleccionaron dos cepas, y el mismo inóculo recuperado se sembró en placas que se incubaron a 37°C o a RT antes del recuento de UFCs.

En las gráficas de las Figuras 17 y 18, se muestran las curvas de supervivencia (%) de las cepas LMG 10559 (cepa de referencia) y HUMV 6207 (cepa clínica), respectivamente, comparando el número de bacterias cultivables en cada condición y superficie tras incubarlas durante 24 h a 37°C (línea negra) o a RT (verde) en medio LA. En ninguno de los casos hubo diferencias estadísticamente significativas.

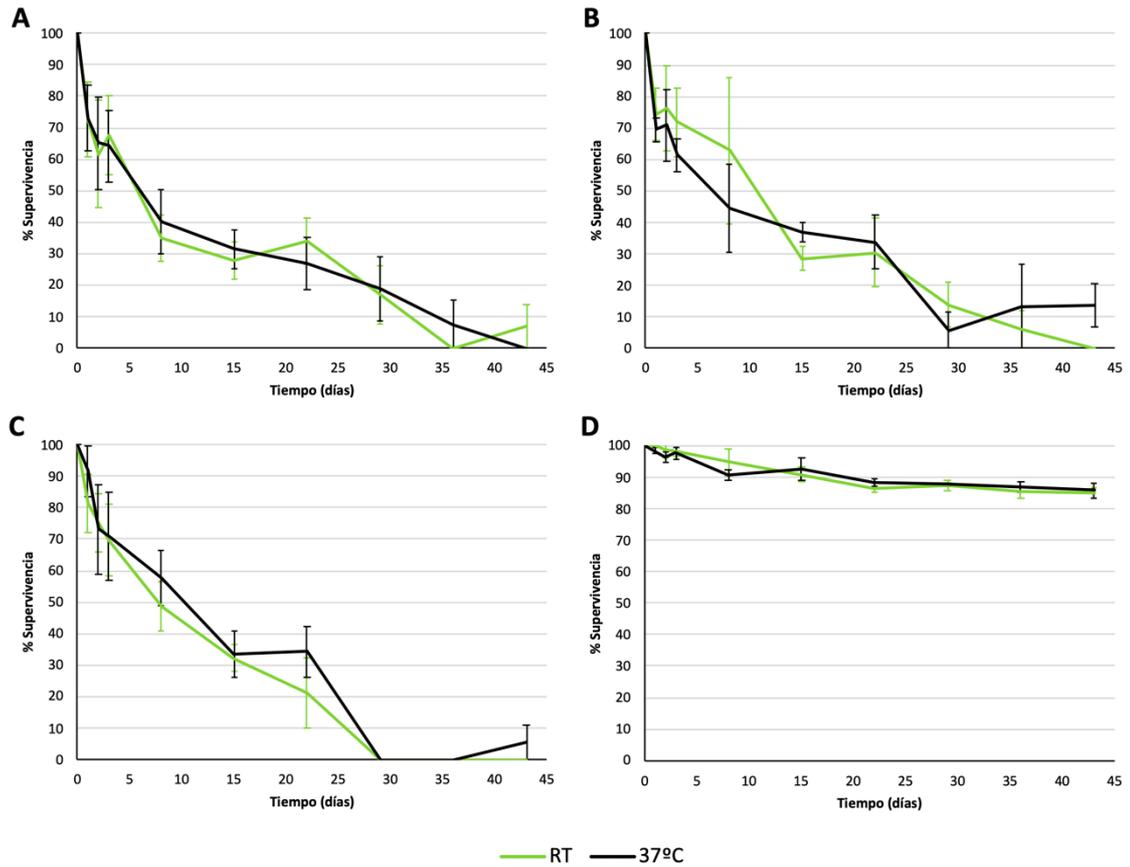


Figura 17: Curva de supervivencia relativa de la cepa LMG 10559 en medio LA. Placas incubadas a RT (verde) y a 37°C (negro). Cada punto es la media de 3 experimentos independientes con el error estándar representado (\pm SE). A, plástico; B, cristal; C, bata de laboratorio; D, solución salina 0,9%.

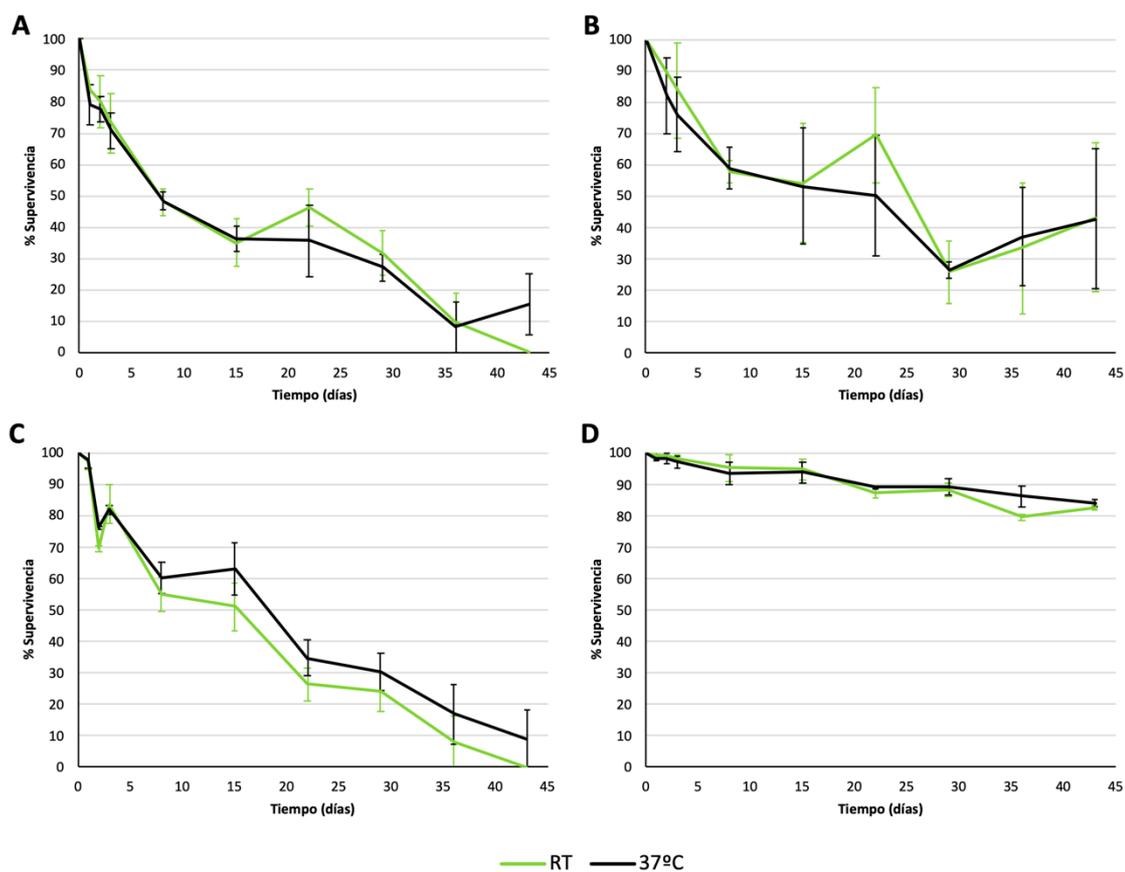


Figura 18: Curva de supervivencia relativa de la cepa HUMV 6207 en medio LA. Placas incubadas a RT (verde) y a 37°C (negro). Cada punto es la media de 3 experimentos independientes con el error estándar representado (\pm SE). A, plástico; B, cristal; C, bata de laboratorio; D, solución salina 0,9%.

Por otro lado, las gráficas de las Figuras 19 y 20 muestran las mismas combinaciones que en el caso anterior pero incubando en este caso las bacterias en medio LA+P. En este caso tampoco existieron diferencias estadísticamente significativas para ninguna combinación de cepa y/o condición.

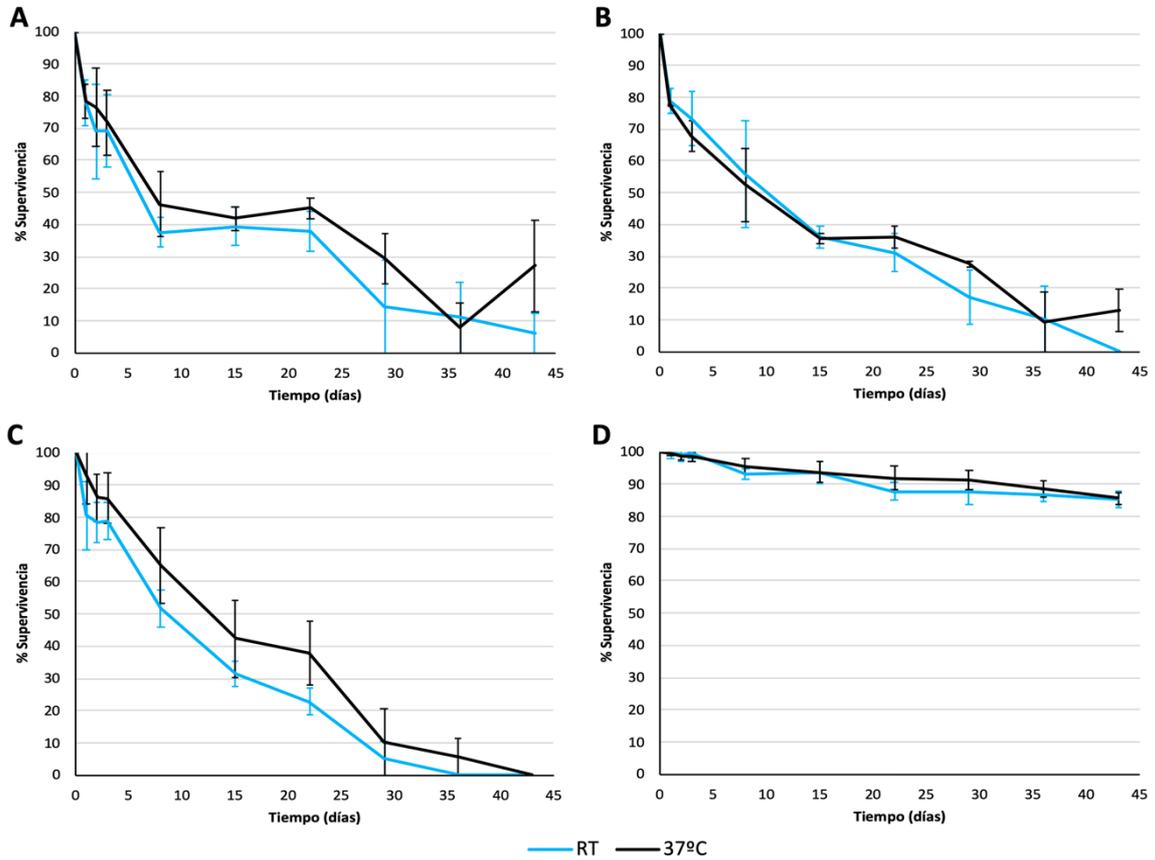


Figura 19: Curva de supervivencia relativa de la cepa LMG 10559 en medio LA+P. Placas incubadas a RT (azul) y a 37°C (negro). Cada punto es la media de 3 experimentos independientes con el error estándar representado (\pm SE). A, plástico; B, cristal; C, bata de laboratorio; D, solución salina 0,9%.

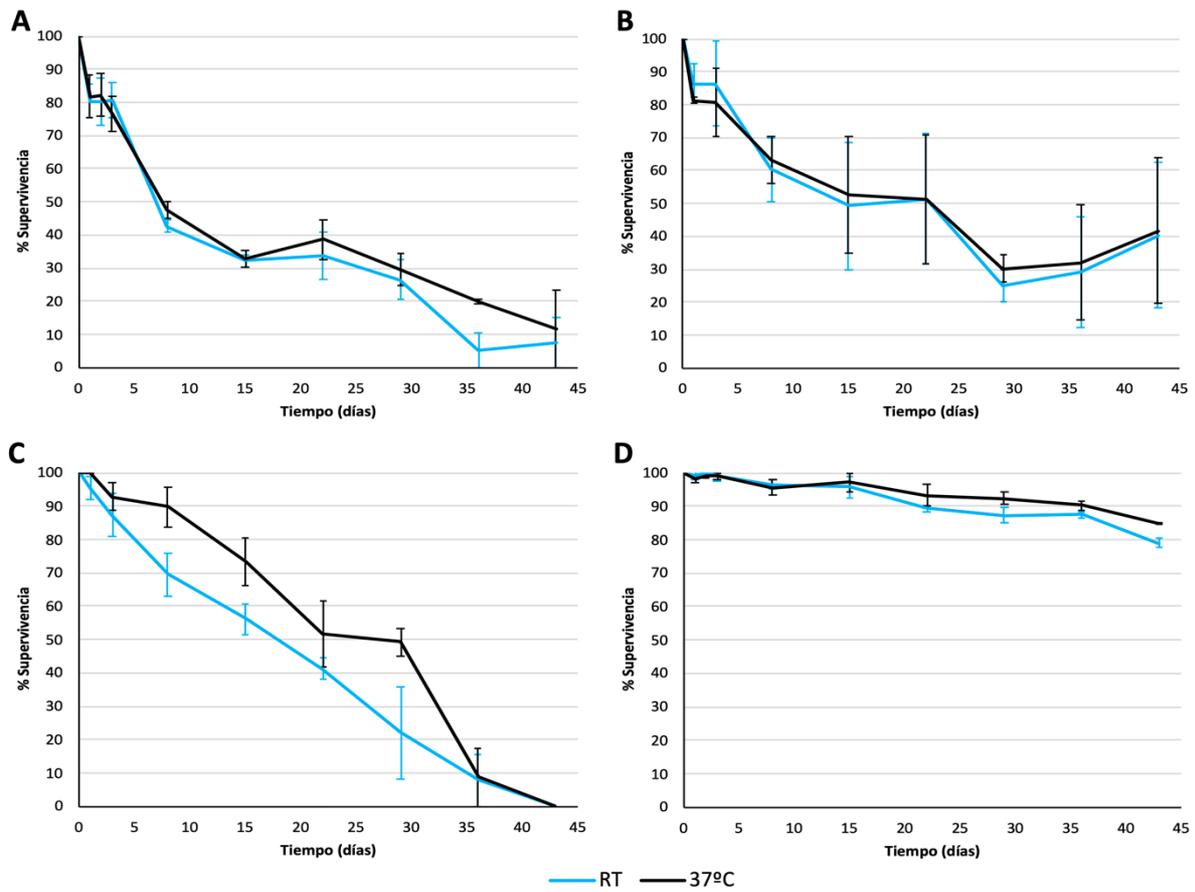


Figura 20: Curva de supervivencia relativa de la cepa HUMV 6207 en medio LA+P. Placas incubadas a RT (azul) y a 37°C (negro). Cada punto es la media de 3 experimentos independientes con el error estándar representado (\pm SE). A, plástico; B, cristal; C, bata de laboratorio; D, solución salina 0,9%.

ii. Efecto del medio de cultivo

- *Acinetobacter baumannii*

La Figura 21 muestra la supervivencia relativa (%) de cada una de las cepas de *A. baumannii* usadas en las diferentes condiciones utilizadas (Fig. 21-A, plástico; Fig. 21-B, cristal; Fig. 21-C, bata de laboratorio; Fig. 21-D, solución salina 0,9%) emplando como medio de cultivo Luria agar, y una temperatura de incubación de 37°C. Los porcentajes de bacterias cultivables para cada cepa tras 2 meses en condiciones de desecación o privación de nutrientes están recogidos en la Tabla 14.

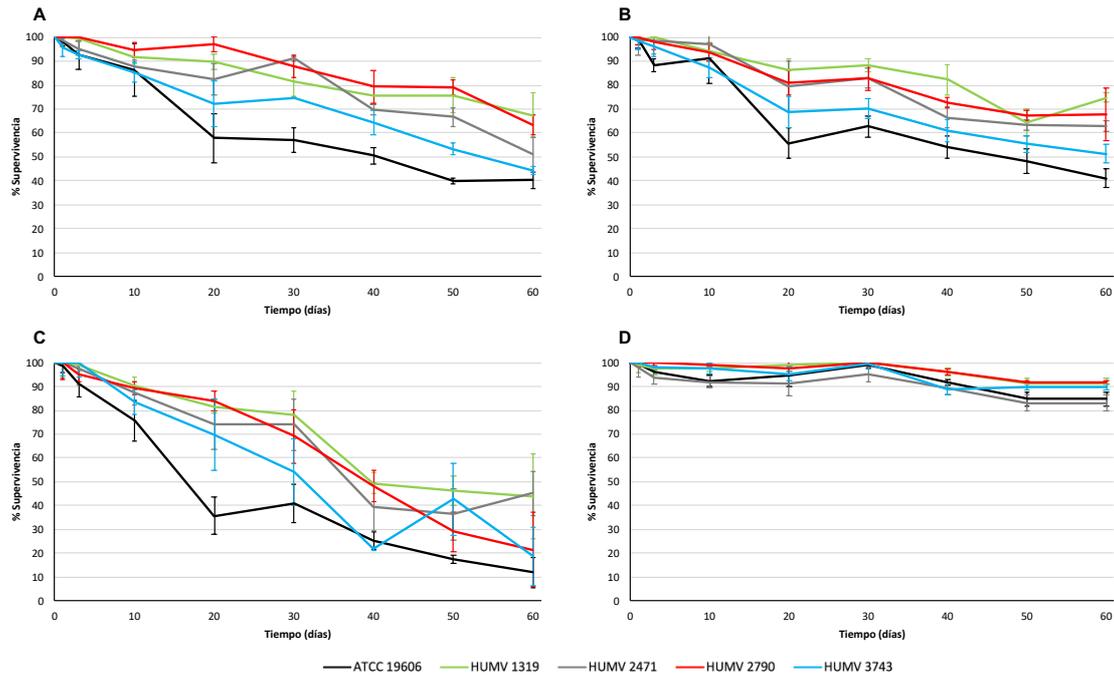


Figura 21: Curvas de supervivencia individuales de las cepas de *A. baumannii*, crecidas en medio LA. Agrupadas por superficie o condición (A: plástico; B: cristal; C: bata de laboratorio; D: solución salina 0,9%) durante 60 días. Cada punto representa la media de 3 experimentos independientes y las barras de error el error estándar (\pm SE) de los mismos.

| | ATCC 19606 | HUMV 1319 | HUMV 2471 | HUMV 2790 | HUMV 3743 |
|-----------------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Plástico | 40,32 | 67,51 | 50,98 | 63,47 | 44,41 |
| Cristal | 41,05 | 74,76 | 63,01 | 67,79 | 51,41 |
| Bata | 11,89 | 43,85 | 45,12 | 21,45 | 18,79 |
| Salino | 84,66 | 91,05 | 83,07 | 91,75 | 89,79 |

Tabla 14: Número final de bacterias cultivables en LA (en %) de cada cepa de *A. baumannii* tras 60 días en las diferentes condiciones desfavorables.

Al comparar la supervivencia de cada cepa tras 60 días en las diferentes superficies se encontraron las siguientes diferencias estadísticamente significativas:

- ATCC 19606: entre solución salina y la desecación, y entre la bata y las otras 2 superficies ($p < 0,05$).
- HUMV 1319: entre solución salina y desecación en cristal ($p < 0,01$).

- HUMV 2471: entre solución salina y desecación en plástico y bata ($p<0,05$), y entre salino y cristal ($p<0,01$).
- HUMV 2790: entre solución salina y desecación en plástico y bata ($p<0,05$).
- HUMV 3743: entre solución salina y desecación en cristal y bata ($p<0,05$) y entre salino y plástico ($p<0,001$).

También se evaluaron las diferencias de supervivencia de las distintas cepas entre ellas en las distintas condiciones, obteniendo que:

- Plástico: diferencias significativas entre la cepa HUMV 2790 y las cepas ATCC 19606 y HUMV 3743 ($p<0,05$).
- Cristal: diferencias significativas entre HUMV 1319 - HUMV 2471, HUMV 1319 - HUMV 3743 y ATCC 19606 - HUMV 2471 ($p<0,05$), y ATCC 19606 - HUMV 1319 ($p<0,01$).

Por otro lado, en la Figura 22 se recoge la supervivencia relativa (%) de las mismas cepas y en las mismas condiciones, cultivadas en este caso con medio de resucitación LA+P (0,5%), y de nuevo a 37°C.

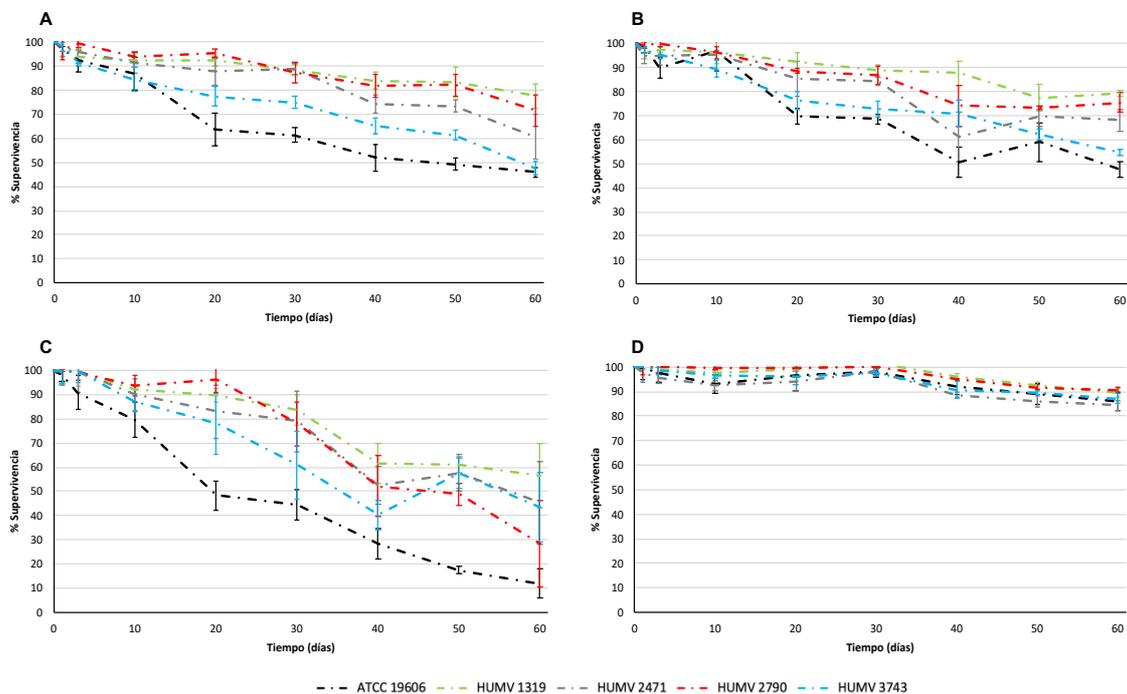


Figura 22: Curvas de supervivencia individuales de las cepas de *A. baumannii*, crecidas en medio LA+P. Agrupadas por superficie o condición (A: plástico; B: cristal; C: bata de laboratorio; D: solución salina 0,9%) durante 60 días. Cada punto representa la media de 3 experimentos independientes y las barras de error el error estándar (\pm SE) de los mismos.

La Tabla 15 muestra el total de bacterias cultivables (en porcentaje) tras 2 meses en condiciones desfavorables al emplear medio suplementado con piruvato para su crecimiento.

| | ATCC 19606 | HUMV 1319 | HUMV 2471 | HUMV 2790 | HUMV 3743 |
|-----------------|-----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Plástico | 45,90 | 77,67 | 60,75 | 71,58 | 47,56 |
| Cristal | 47,54 | 79,25 | 68,05 | 75,53 | 54,72 |
| Bata | 11,90 | 56,37 | 45,19 | 28,32 | 43,40 |
| Salino | 85,92 | 89,59 | 84,25 | 90,32 | 87,15 |

Tabla 15: Número final de bacterias cultivables (en %) en LA+P de cada cepa de *A. baumannii* tras 60 días en las diferentes condiciones desfavorables.

El medio de resucitación se empleó para confirmar o descartar el estado VBNC de las células bacterianas en condiciones de estrés. A nivel individual no se observaron diferencias significativas entre el número de bacterias cultivables de las distintas cepas en medio LA y medio LA+P, para las distintas condiciones, soportando la carencia de ese estado en dichas cepas de *A. baumannii*. Este hecho también se comprobó de manera conjunta para las 5 cepas, como se muestra en la Figura 23, en la que se superponen las curvas de supervivencia obtenidas tras el cultivo en ambos medios, observándose de nuevo la misma tendencia que descarta el estado VBNC en *A. baumannii*.

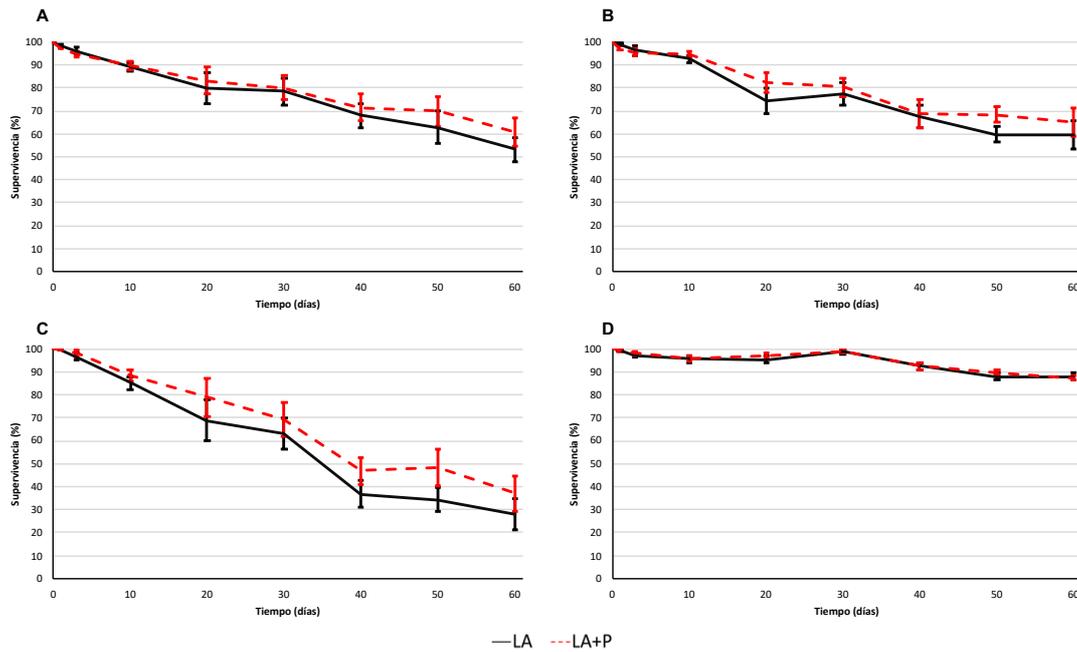


Figura 23: Curvas de supervivencia conjuntas de las 5 cepas de *A. baumannii* (A: plástico; B: cristal; C: bata de laboratorio; D: solución salina 0,9%) durante 60 días. Cada punto representa la media de 3 experimentos independientes de las 5 cepas, y las barras de error el error estándar (\pm SE). En negro representada la curva obtenida al cultivar las bacterias en medio Luria agar; y en rojo discontinuo al hacerlo en medio suplementado con piruvato sódico (0,5%).

Valores finales (%) para LA y LA+P, respectivamente: A, 53,33 y 60,69; B, 59,60 y 65,02; C, 28,22 y 37,04; D, 87,45 y 88,06.

- *Acinetobacter pittii*

Las mismas condiciones se aplicaron a las 6 cepas de *A. pittii*, con un periodo máximo de 43 días. La Figura 24 recoge las curvas de supervivencia de las cepas individuales durante el periodo de estrés en las distintas condiciones y superficies (Fig. 24-A, plástico; Fig. 24-B, cristal; Fig. 24-C, bata de laboratorio; Fig. 24-D, solución salina).

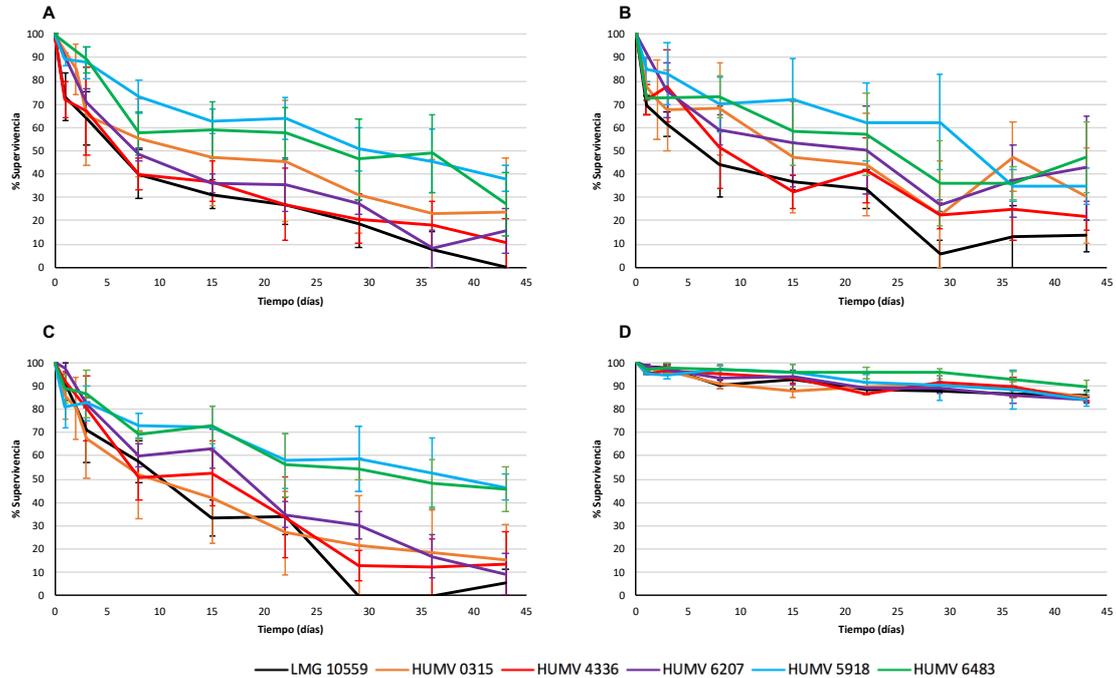


Figura 24: Curvas de supervivencia individuales de las cepas de *A. pittii*, crecidas en medio LA, agrupadas por superficie o condición (A: plástico; B: cristal; C: bata de laboratorio; D: solución salina 0,9%) durante 43 días. Cada punto representa la media de 3 experimentos independientes y las barras de error el error estándar (\pm SE) de los mismos.

Los valores medios de supervivencia para cada cepa en cada condición al final del experimento están recogidos en la Tabla 16.

| | LMG 10559 | HUMV 0315 | HUMV 4336 | HUMV 6207 | HUMV 5918 | HUMV 6483 |
|-----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Plástico | 0 | 23,58 | 10,47 | 15,55 | 37,95 | 27,12 |
| Cristal | 13,51 | 30,67 | 22,07 | 42,82 | 34,94 | 47,27 |
| Bata | 5,55 | 15,35 | 13,77 | 9,12 | 46,55 | 45,98 |
| Salino | 85,79 | 85,43 | 83,90 | 84,06 | 84,39 | 89,41 |

Tabla 16: Número final de bacterias cultivables en LA (en %) de cada cepa de *A. pittii* tras 43 días en las diferentes condiciones desfavorables.

Al comparar la supervivencia de cada cepa tras 43 días en las distintas superficies y condiciones se encontraron las siguientes diferencias estadísticamente significativas:

- LMG 10559: entre solución salina y desecación en plástico y bata ($p < 0,001$), y entre salino y cristal ($p < 0,01$).
- HUMV 0315: entre solución salina y desecación en bata ($p < 0,05$).
- HUMV 4336: entre solución salina y desecación en todas las superficies ($p < 0,05$).
- HUMV 6207: entre solución salina y desecación en plástico y bata ($p < 0,05$).
- HUMV 5918: entre solución salina y desecación en bata ($p < 0,05$) y entre salino y desecación en plástico y cristal ($p < 0,001$).
- HUMV 6483: entre solución salina y desecación en plástico y bata ($p < 0,05$).

También se evaluaron las diferencias de supervivencia de las distintas cepas entre ellas en las distintas condiciones, obteniendo que:

- Plástico: diferencias significativas entre la cepa LMG 10559 y la cepa HUMV 5918 ($p < 0,05$).
- Bata: diferencias significativas entre LMG 10559 - HUMV 6483, HUMV 6207 - HUMV 5918 y HUMV 6207 - HUMV 6483 ($p < 0,05$), y LMG 10559 - HUMV 6483 ($p < 0,01$).

Por otro lado, en la Figura 25 se muestran las curvas de supervivencia relativa (%) de las cepas cultivadas en los distintos tiempos en medio de resucitación LA+P.

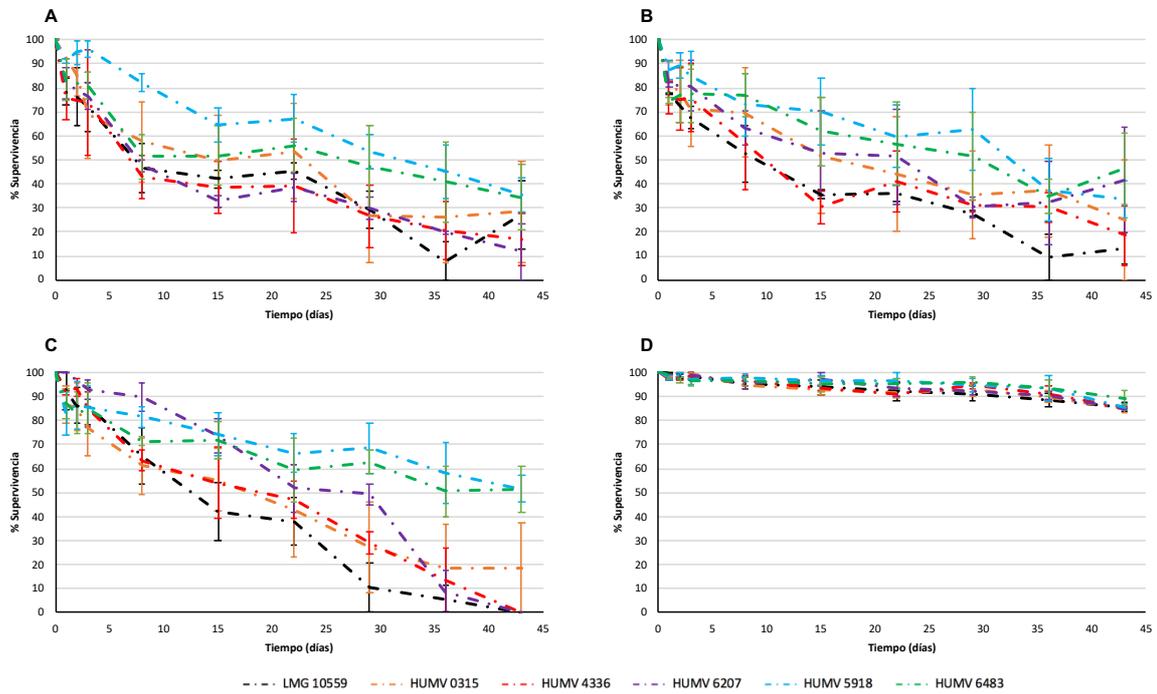


Figura 25: Curvas de supervivencia individuales de las cepas de *A. pittii*, crecidas en medio LA+P. Agrupadas por superficie o condición (A: plástico; B: cristal; C: bata de laboratorio; D: solución salina 0,9%) durante 60 días. Cada punto representa la media de 3 experimentos independientes y las barras de error el error estándar (\pm SE) de los mismos.

Los valores medios de los 3 experimentos, del número final de bacterias cultivables, se muestran en la Tabla 17.

| | LMG 10559 | HUMV 0315 | HUMV 4336 | HUMV 6207 | HUMV 5918 | HUMV 6483 |
|-----------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Plástico | 27,13 | 28,33 | 17,04 | 11,74 | 35,55 | 34,33 |
| Cristal | 13,06 | 25,12 | 18,50 | 41,69 | 33,33 | 46,38 |
| Bata | 0 | 18,60 | 0 | 0 | 51,63 | 51,40 |
| Salino | 85,68 | 84,92 | 85,57 | 84,84 | 85,51 | 89,39 |

Tabla 17: Número final de bacterias cultivables (en %) en LA+P de cada cepa de *A. pittii* tras 43 días en las diferentes condiciones desfavorables.

En ningún caso se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el número de células cultivables en medio Luria o en medio de resucitación a nivel individual. Para evaluar la posibilidad de un comportamiento diferencial a nivel de especie, se calcularon las curvas de supervivencia del conjunto de las 6 cepas por triplicado en cada una de las condiciones, como se muestra en la Figura 26. A nivel de especie no hubo tampoco diferencias significativas, por lo que esta bacteria no entra en estado VBNC.

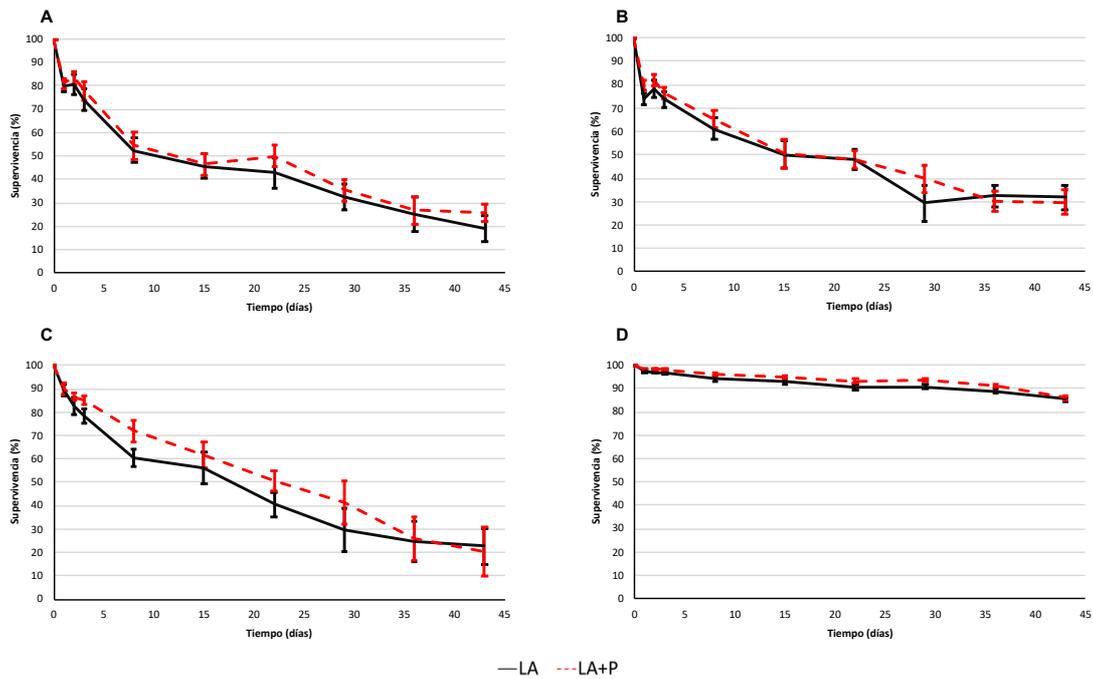


Figura 26: Curvas de supervivencia conjuntas de las 6 cepas de *A. pittii* (A: plástico; B: cristal; C: bata de laboratorio; D: solución salina 0,9%) durante 60 días. Cada punto representa la media de 3 experimentos independientes de las 6 cepas, y las barras de error el error estándar (\pm SE). En negro representada la curva obtenida al cultivar las bacterias en medio Luria agar; y en rojo discontinuo al hacerlo en medio suplementado con piruvato sódico (1%).
 Valores finales (%) para LA y LA+P, respectivamente: A, 19,11 y 25,69; B, 31,88 y 29,68; C, 22,07 y 20,27; D, 85,50 y 85,99.

c. Microscopía confocal

Las bacterias mantenidas en cubreobjetos como superficie de cristal, se tiñeron empleando el kit de viabilidad bacteriana *BacLight LIVE/DEAD* a intervalos representativos durante los periodos de desecación para su visualización en microscopía confocal.

- *Acinetobacter baumannii*

La Figura 27 recoge las imágenes representativas de campos aleatorios de las distintas cepas de *A. baumannii* (Fig. 27-A) durante el periodo de desecación a intervalos de 20 días, mostrando la transición de una población en su mayoría viable (en día 0 la mayoría de las células se hayan teñidas en verde) a una población con predominio de células con las membranas citoplasmáticas comprometidas (rojo o naranja). También recoge una cuantificación (Fig. 27-B) más precisa usando el software NIS-Elements del número de píxeles (como % de biomasa) verdes (representando bacterias vivas) y rojos (bacterias muertas) a lo largo del periodo de desecación.

- *Acinetobacter pittii*

El mismo proceso se llevó a cabo con las 6 cepas de *A. pittii*, como se recoge en la Figura 28. En la Fig. 28-A se muestran los campos aleatorios de microscopía confocal a intervalos de tiempo representativos observando el incremento de células teñidas en rojo (o naranja) con el paso del tiempo. La Fig. 28-B muestra la cuantificación de dichos campos.

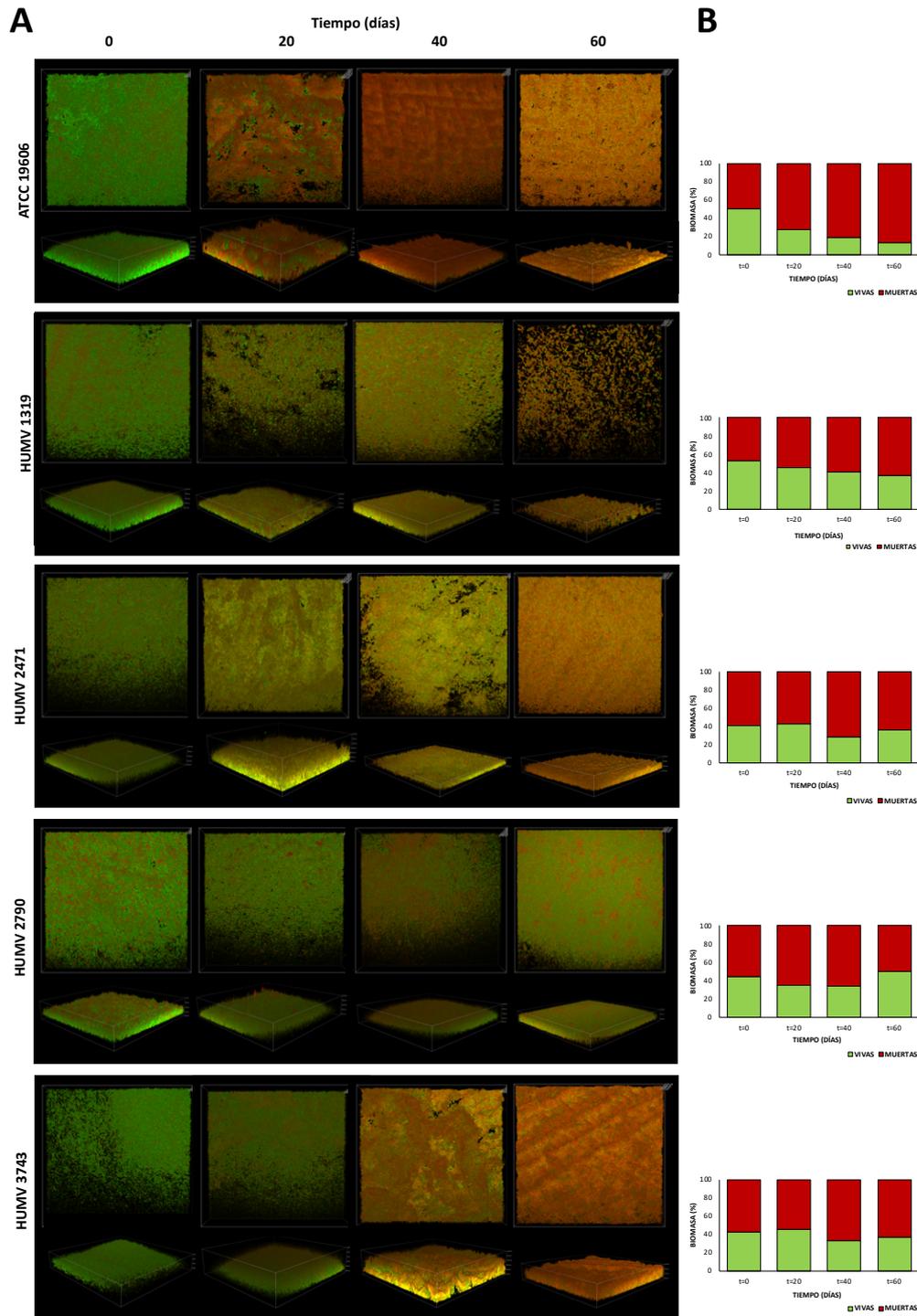


Figura 27: Microscopía confocal de células vivas/muertas de *A. baumannii*. De arriba a abajo, colección de imágenes (A) y su cuantificación (B) de las distintas cepas.

A: Imágenes de CLSM con el kit de tinción para viabilidad *BacLight LIVE/DEAD* de las 5 cepas de *A. baumannii* tras inoculación y desecación en cristal (cubre objetos) a distintos tiempos (hasta 60 días). Las células vivas teñidas en verde con Syto 9, y las células muertas en rojo con yoduro de propidio. Magnificación original: $\times 400$. Imágenes superiores de cada colección en máxima proyección y reconstrucción 3D en las inferiores.

B: Cuantificación en porcentaje de biomasa de las células fluorescentes (verde/rojo) de imágenes representadas de cada cepa a su izquierda.

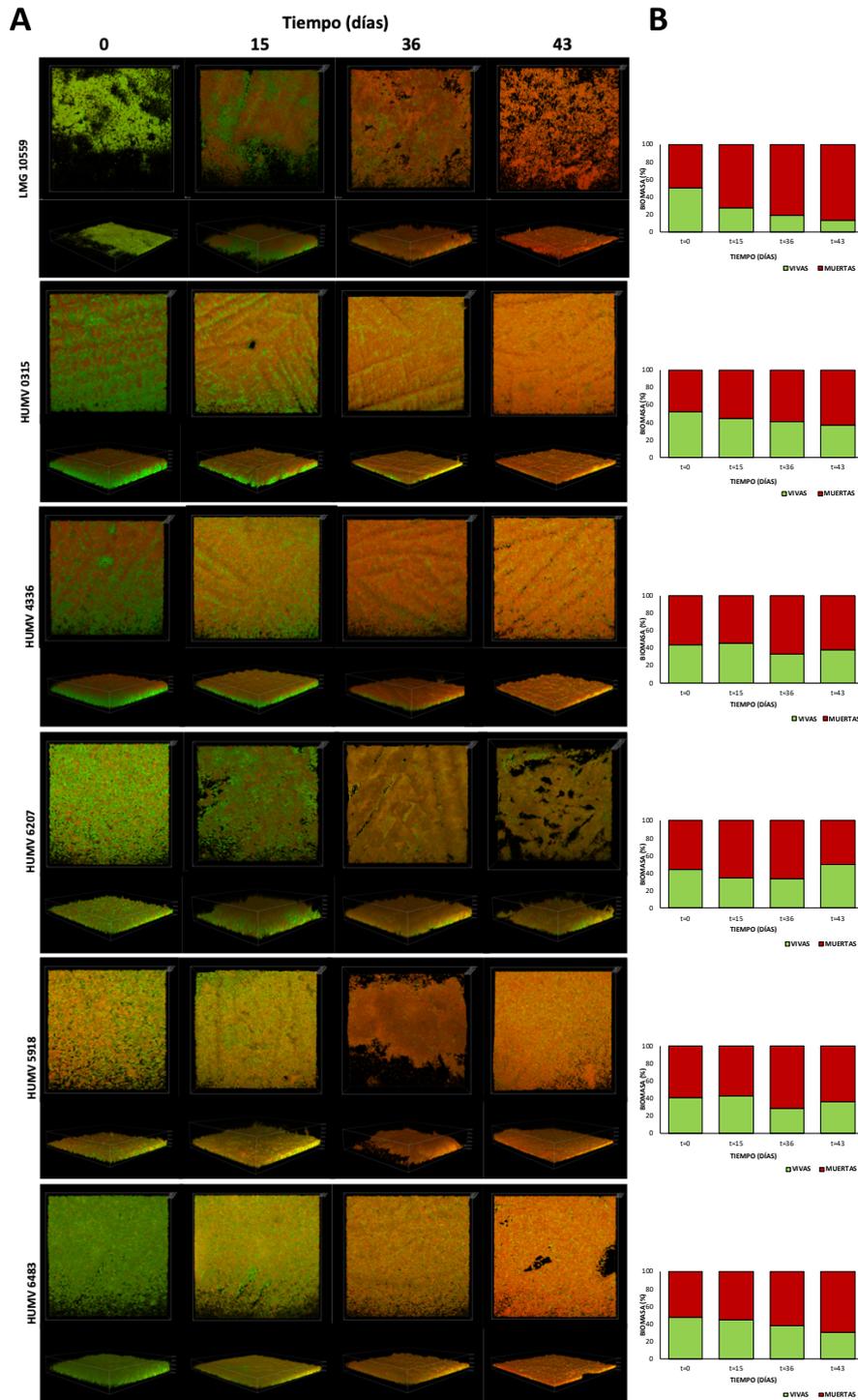


Figura 28: Microscopía confocal de células vivas/muertas de *A. pittii*. De arriba a abajo, colección de imágenes (A) y su cuantificación (B) de las distintas cepas.

A: Imágenes de CLSM con el kit de tinción para viabilidad *BacLight LIVE/DEAD* de las 6 cepas de *A. pittii* tras inoculación y desecación en cristal (cubre objetos) a distintos tiempos (hasta 43 días). Las células vivas teñidas en verde con Syto 9, y las células muertas en rojo con yoduro de propidio. Magnificación original: $\times 400$. Imágenes superiores de cada colección en máxima proyección y reconstrucción 3D en las inferiores.

B: Cuantificación en porcentaje de biomasa de las células fluorescentes (verde/rojo) de imágenes representadas de cada cepa a su izquierda.

d. Adherencia a superficies abióticas

Tras el periodo de desecación o privación de nutrientes en humedad se evaluó la capacidad de adherencia a superficies abióticas de las cepas, analizando para ello la capacidad de formación de biofilm y la velocidad de recuperación durante la incubación entre los diferentes periodos de muestreo.

i. Capacidad de formación de biofilm

- *Acinetobacter baumannii*

La capacidad de formación de biofilm se evaluó mediante tinción con CV de los pocillos tras 48 h de incubación con medio Luria, cuyo resultado se observa en la Figura 29. A simple vista se observa que la cantidad de biofilm en anillo formado en la interfase varía entre cepas y condiciones.

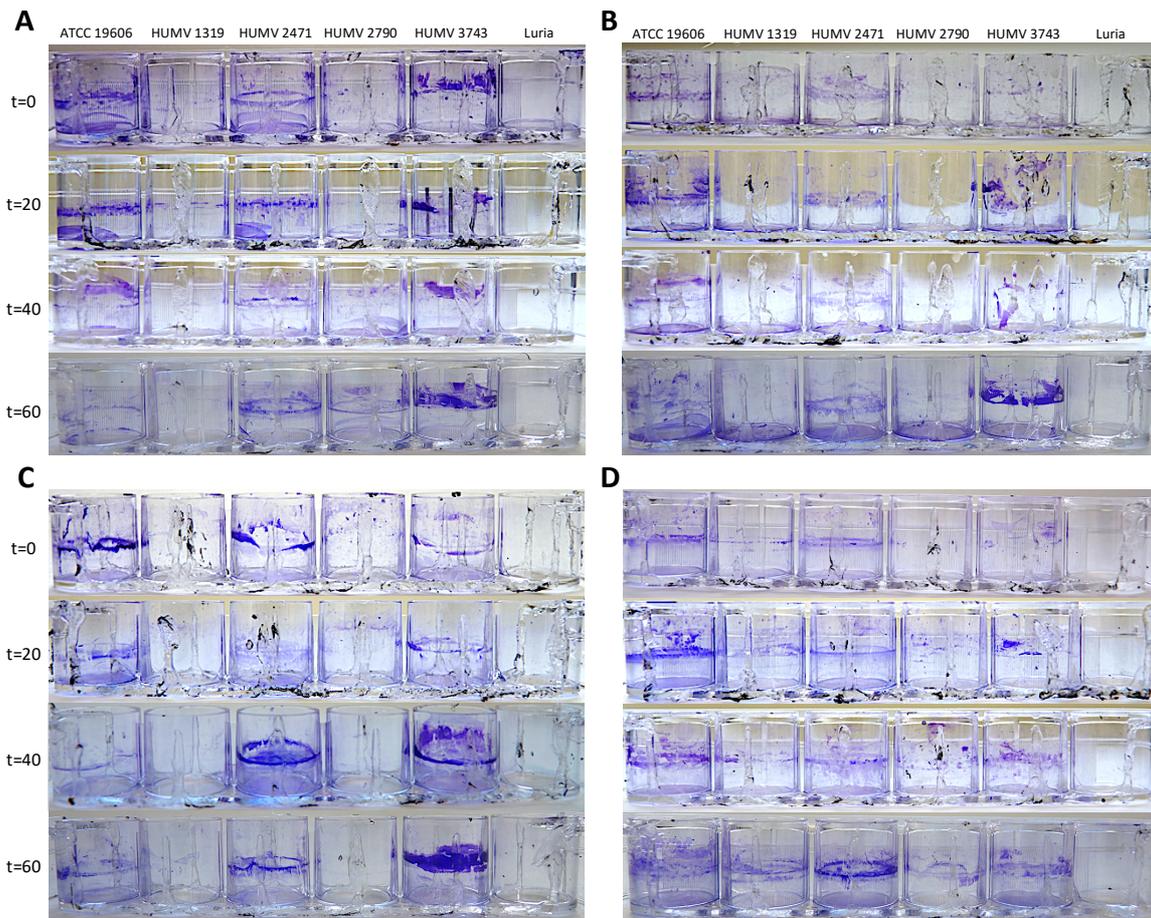


Figura 29: Fotografías transversales representativas de los pocillos con los biofilms de *A. baumannii* teñidos con CV. Formación diferencial de biofilm por las distintas cepas inoculadas y mantenidas durante distintos periodos de tiempo en: A, plástico; B, cristal; C, bata de laboratorio; D, solución salina. De izquierda a derecha, en cada colección de fotografías, 5 cepas de *A. baumannii* utilizadas y control negativo (Luria). De arriba abajo, distintos intervalos de tiempo (en días) en que se mantuvieron las bacterias en las distintas condiciones.

Posteriormente se cuantificó la cantidad de colorante adherido, proporcional a la cantidad de biofilm formado y se normalizó con la densidad celular (medida como UFCs), obteniendo el resultado que se recoge en las gráficas de la Figura 30.

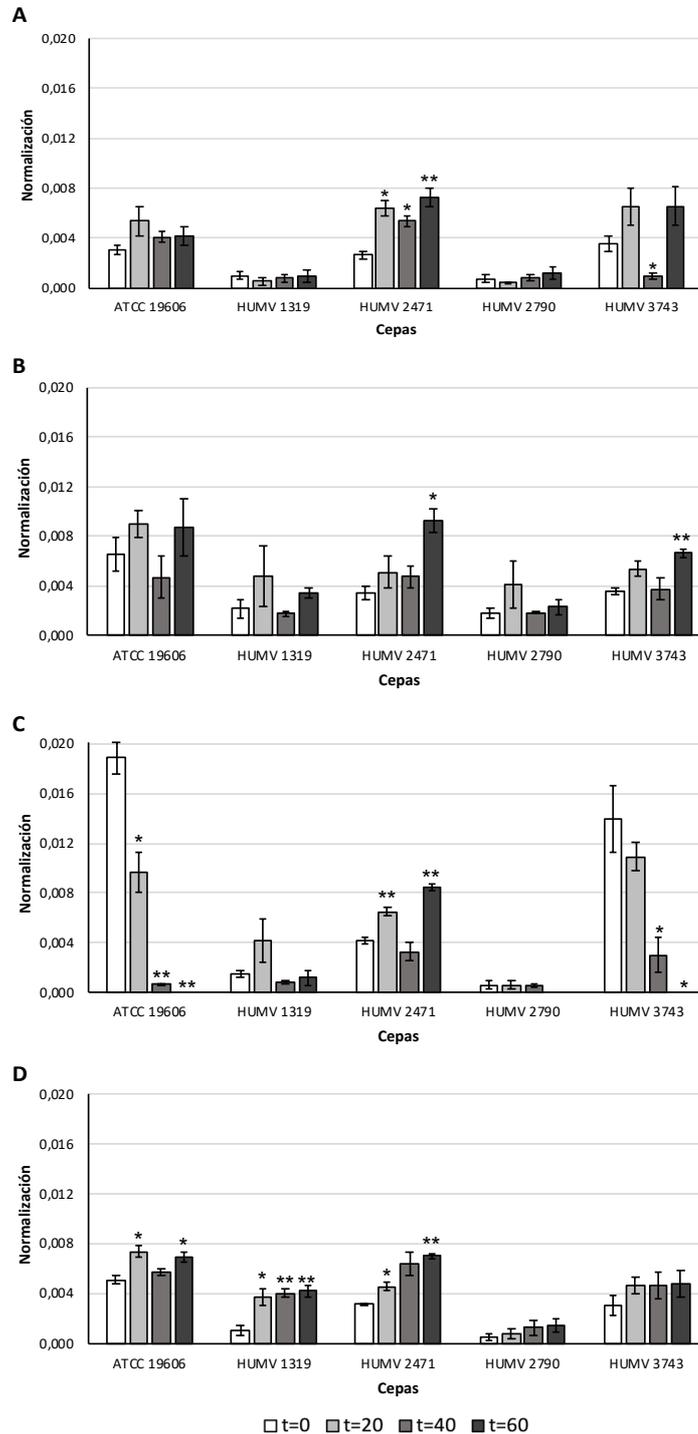


Figura 30: Cuantificación de la formación de biofilm por cepas de *A. baumannii*. Cantidad de biofilm formado por las distintas cepas en las distintas condiciones de desecación (A, plástico; B, cristal; C, bata de laboratorio) y privación de nutrientes en humedad (D, solución salina) tras añadir medio Luria. Para cada cepa, de izquierda a derecha, biofilm formado en tiempos 0, 20, 40 y 60 días. Cada barra representa la media de 3 experimentos independientes con el error estándar (\pm SE). La leyenda muestra los distintos tiempos de desecación (en días). Al comparar t=60 con t=0: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

De esta manera se pueden observar cuantitativamente las diferencias que existen en el fenotipo de adherencia de las distintas cepas utilizadas.

Si bien se observa que en la mayoría de casos las cepas mantienen de manera más o menos estable la capacidad de formación de biofilm, también existen ejemplos en los que aumenta o disminuye de manera significativa, ya que este fenotipo parece ser cepa y superficie dependiente. Un caso particular es la cepa HUMV 2471, que multiplica en todos los casos la cantidad de biofilm formado al comparar el final con el inicio del experimento. Las dos cepas (ATCC 19606 y HUMV 3743) que reducen de manera más marcada el biofilm con el tiempo, tras haber estado en desecación en bata, también exhiben una cantidad del mismo muy aumentada al inicio al compararlo con el resto de condiciones o superficies.

- *Acinetobacter pittii*

Los mismos ensayos, aunque con ligeras variaciones en los intervalos temporales se realizaron con las 6 cepas de *A. pittii*. La representación de los pocillos teñidos con CV se muestra en la Figura 31.

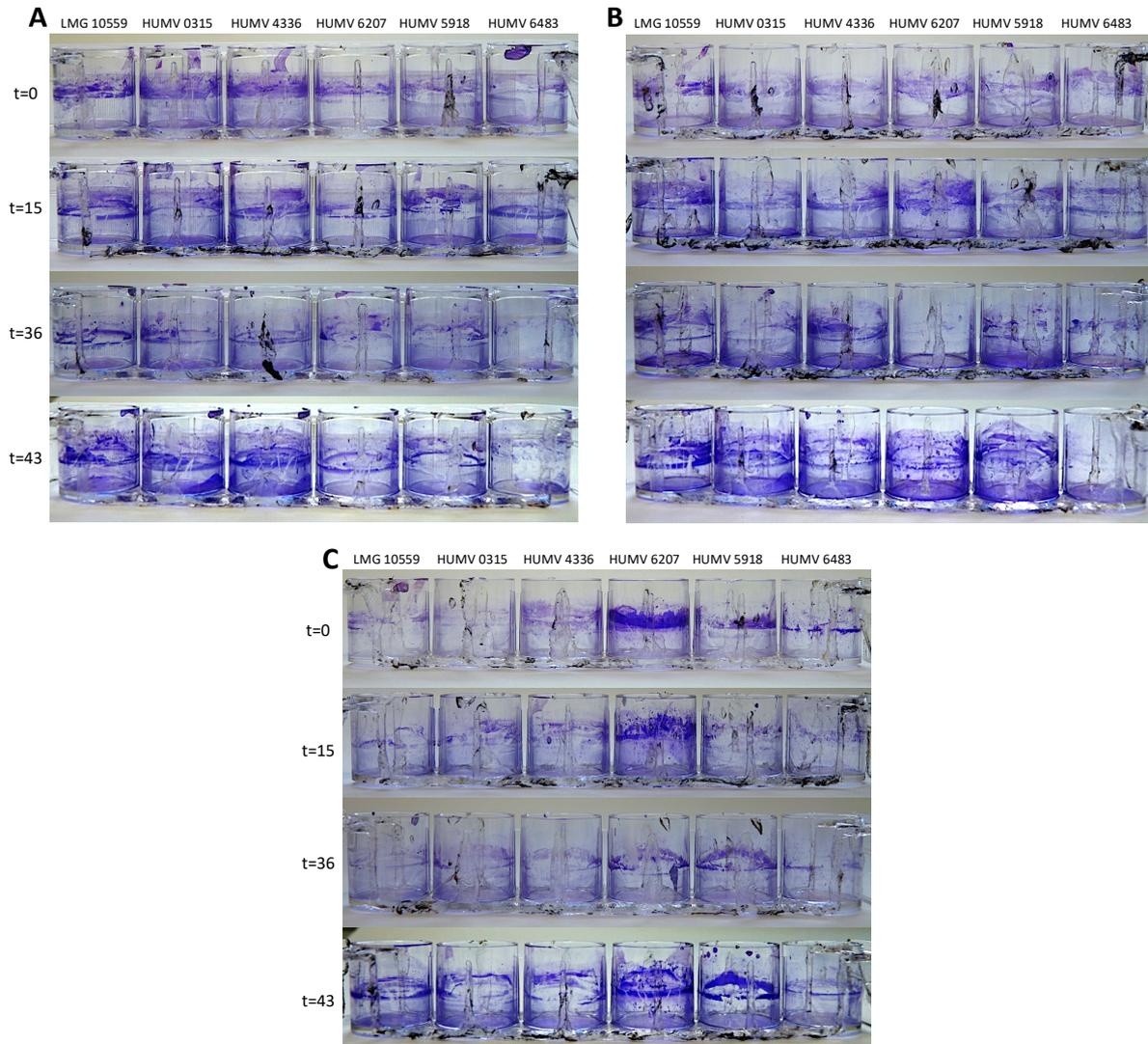


Figura 31: Fotografías transversales representativas de los pocillos con los biofilms de *A. pittii* teñidos con CV. Formación diferencial de biofilm por las distintas cepas inoculadas y mantenidas durante distintos periodos de tiempo en: A, plástico; B, cristal; C, bata de laboratorio. De izquierda a derecha, en cada colección de fotografías, 6 cepas de *A. pittii* utilizadas. De arriba abajo, distintos intervalos de tiempo (en días) en que se mantuvieron las bacterias en las distintas superficies.

De igual modo, se solubilizó el colorante para cuantificar la cantidad de biofilm formado, que se normalizó con la densidad celular de cada bacteria (Figura 32).

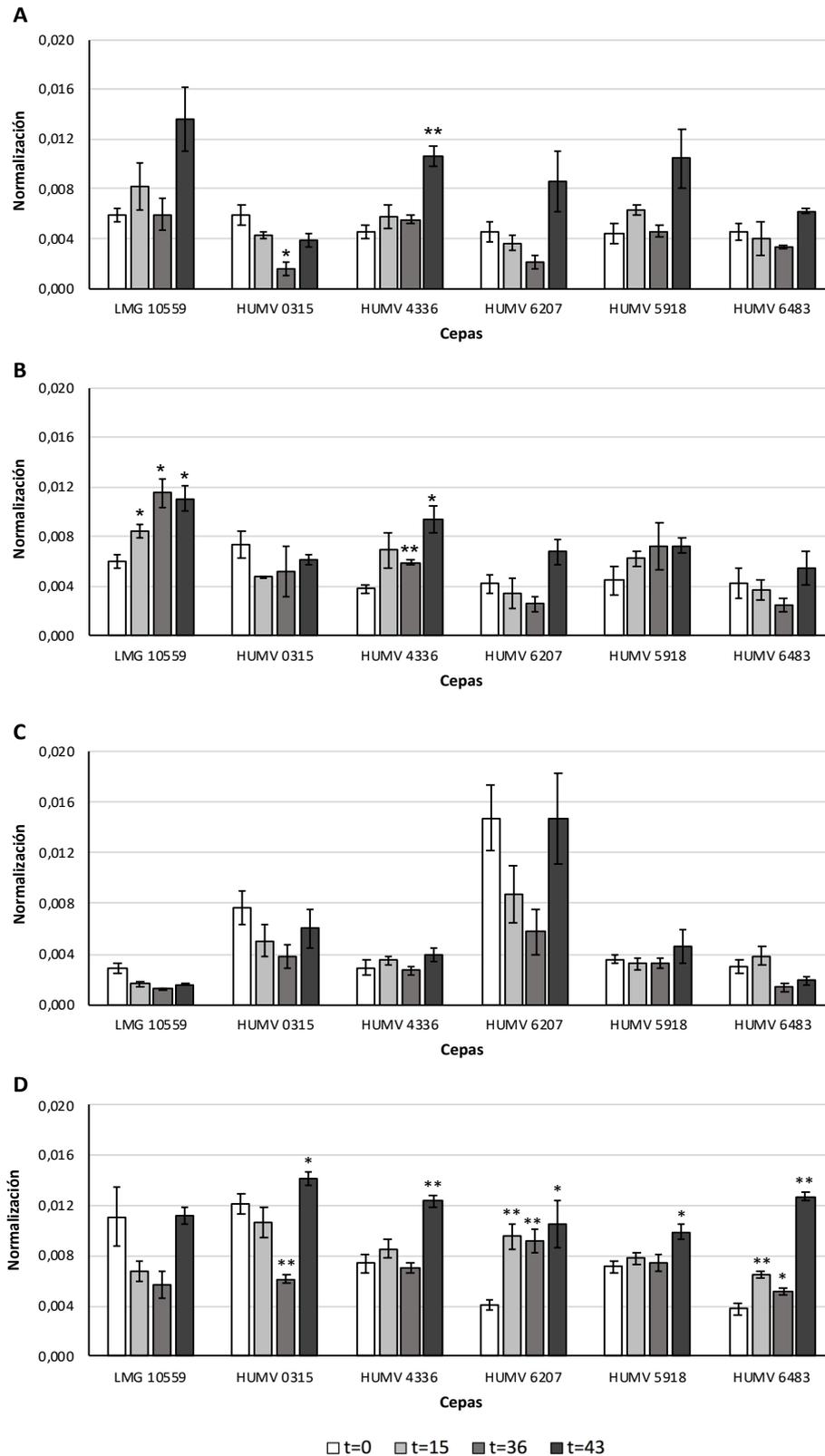


Figura 32: Cuantificación de la formación de biofilm por cepas de *A. pittii*. Cantidad de biofilm formado por las distintas cepas en las distintas condiciones de desecación (A, plástico; B, cristal; C, bata de laboratorio) y privación de nutrientes en humedad (D, solución salina) tras añadir medio Luria. Para cada cepa, de izquierda a derecha, biofilm formado en tiempos 0, 15, 36 y 43 días. Cada barra representa la media de 3 experimentos independientes con el error estándar (\pm SE). La leyenda muestra los distintos tiempos de desecación (en días). Al comparar t=43 con t=0: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Las cepas de *A. pittii* utilizadas en este trabajo mantienen en todos los casos la formación de biofilm tras 6 semanas en condiciones desfavorables. Se observan casos en los que aumenta de manera muy significativa la cantidad de biofilm formado con el tiempo, especialmente para las cepas mantenidas en humedad en solución salina. El comportamiento de cada cepa, así como la cantidad de biofilm formado, varía en cada condición, por lo que el fenotipo adherente no solo depende del aislado sino también de las condiciones a las que sea sometido.

ii. Velocidad de recuperación

Se analizó la capacidad y velocidad de recuperación de las cepas durante las 48 h de incubación para la formación de biofilm. Para ello se tomaron muestras cada 12 h de los cultivos y se sembraron en placas para recuento de UFCs.

- *Acinetobacter baumannii*

La Figura 33 recoge las curvas de crecimiento de las cepas mantenidas en plástico (A), cristal (B) y bata de laboratorio (C) tras haber sido rehidratadas e incubadas con medio Luria. En ella se compara la velocidad de recuperación que muestran las bacterias conforme aumenta el tiempo de desecación. Si bien se parte de un menor número de bacterias cultivables al inicio tras añadir medio fresco, se alcanza una densidad final similar.

- *Acinetobacter pittii*

De manera paralela, la Figura 34 recoge las curvas de crecimiento de las cepas mantenidas en plástico (A), cristal (B) y bata de laboratorio (C) tras haber sido rehidratadas e incubadas con medio Luria. Se compara la velocidad de recuperación que muestran las bacterias de *A. pittii*, del mismo modo que en el caso anterior, obteniendo unos resultados similares. Es decir, tras 48 h se alcanza la misma densidad celular pese a que cuanto más tiempo se encuentran en desecación más tardan en recuperarse y alcanzar el mismo número de bacterias en cultivo.

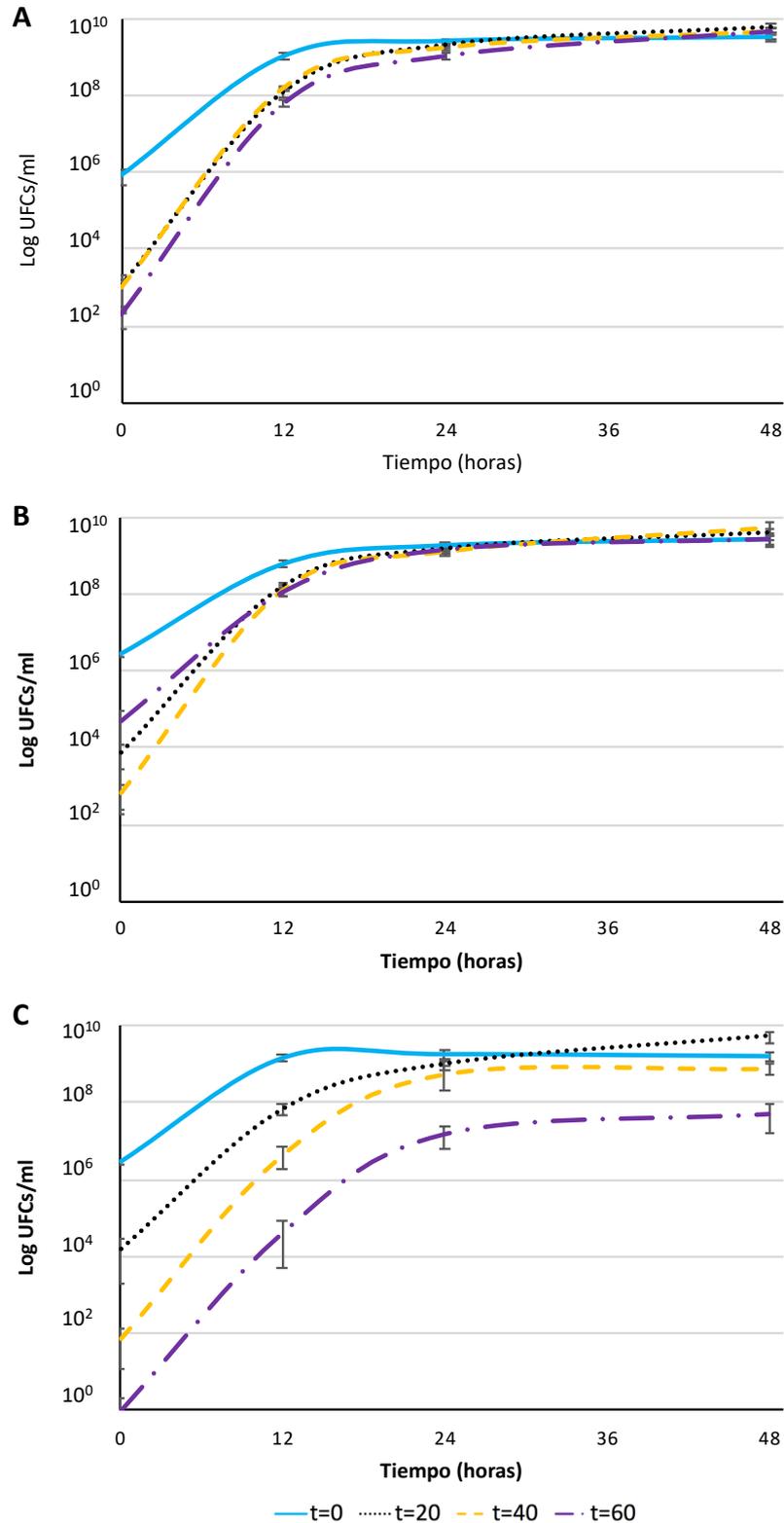


Figura 33: Estimación de la capacidad de reecrecimiento por recuento de UFCs en *A. baumannii*. Los recuentos de UFCs se realizaron a intervalos de 12 h (0 tiempo inicial y 48 h tiempo final). Cada punto representa la media de 3 experimentos independientes de las 5 cepas de *A. baumannii* y el error estándar (\pm SE), comparando las bacterias que han estado durante 0, 20, 40 y 60 días en desecación en plástico (A), cristal (B) y bata de laboratorio (C). La leyenda muestra los distintos tiempos de desecación (en días).

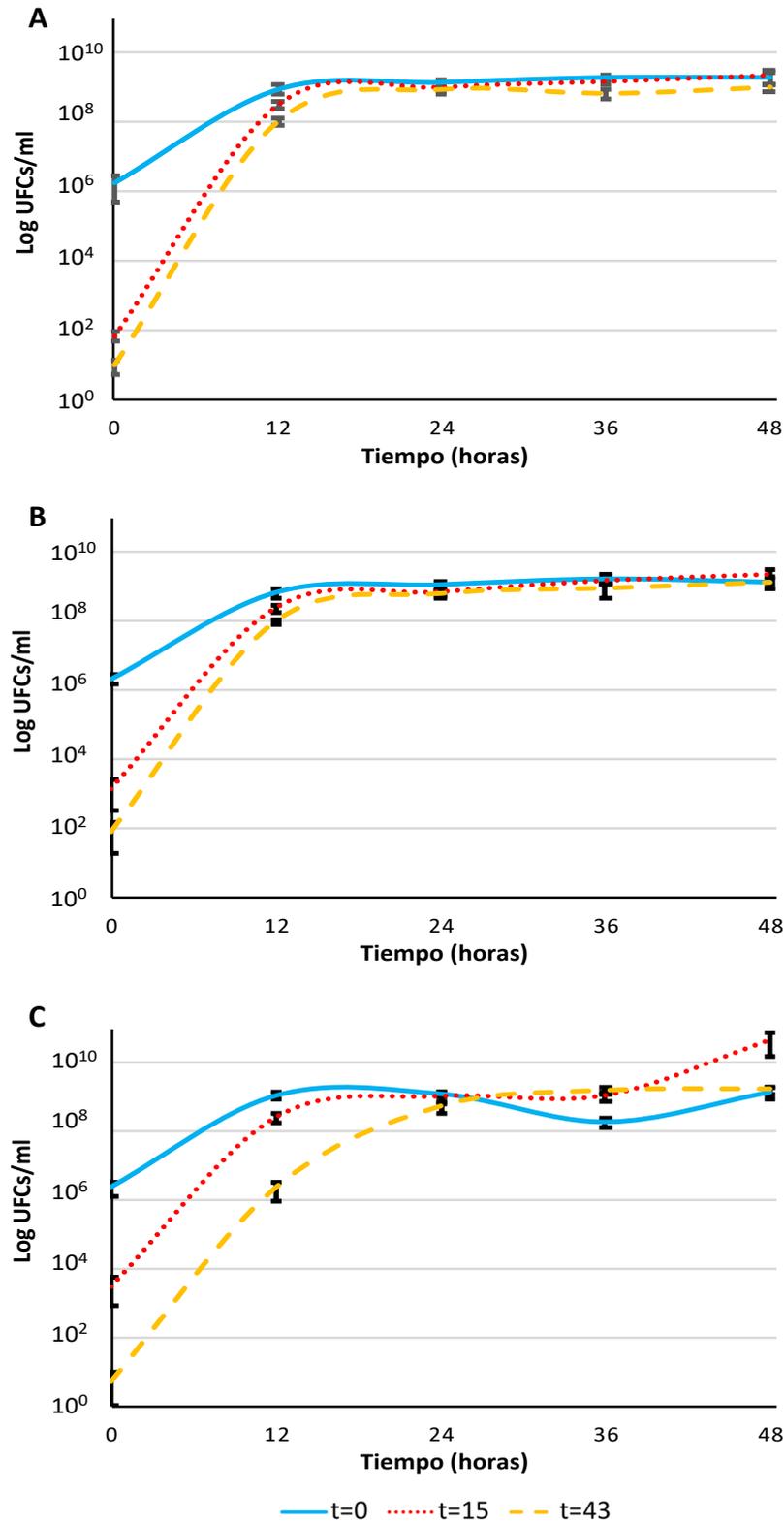


Figura 34: Estimación de la capacidad de recrecimiento por recuento de UFCs en *A. pittii*. Los recuentos de UFCs se realizaron a intervalos de 12 h (0 tiempo inicial y 48 h tiempo final). Cada punto representa la media de 3 experimentos independientes de las 6 cepas de *A. pittii* y el error estándar (\pm SE), comparando las bacterias que han estado durante 0, 15 y 43 días en desecación en plástico (A), cristal (B) y bata de laboratorio (C). La leyenda muestra los distintos tiempos de desecación (en días).

e. Modelo animal de virulencia

Para evaluar la virulencia de *A. baumannii* se realizaron infecciones en larvas de *G. mellonella* comparando la tasa de supervivencia de las mismas al ser inoculadas con la misma suspensión bacteriana (10^5 UFCs) de cultivos frescos de 2 cepas (HUMV 1319 y HUMV 2790) y las mismas cepas mantenidas 60 días en solución salina 0,9% con privación de nutrientes (Figura 35). Se añadieron también 2 controles, para medir la mortalidad natural y para evaluar el trauma físico de la inyección, inoculando el mismo volumen de solución salina estéril.

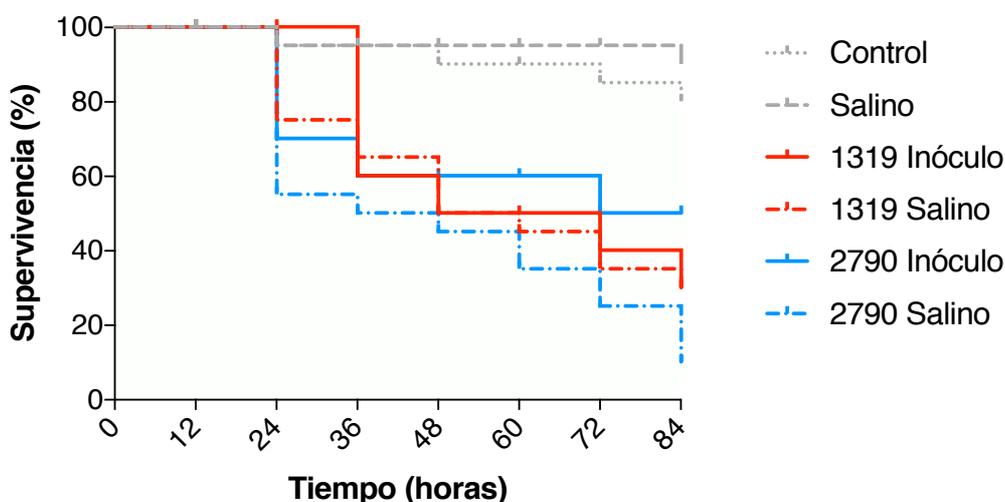


Figura 35: Ensayo de virulencia en *Galleria mellonella*. Tasa de supervivencia de 10 larvas de *G. mellonella* tras infección con 10^5 UFCs de 2 cepas de *A. baumannii* (HUMV 1319 y HUMV 2790) mantenidas en solución salina durante 60 días (salino) e inóculos frescos (inóculo) de las mismas cepas. Incluidos 2 controles (en gris), larvas sin manipular (control) e inoculadas con solución salina estéril (salino). Los resultados son la media de 2 experimentos independientes.

El recuento de larvas muertas se realizó cada 12 h, y tras 84 h (3,5 días) se vio que *A. baumannii*, al menos las cepas utilizadas, no perdían la virulencia sobre *G. mellonella* tras estar durante 60 días bajo dichas condiciones de estrés. Los inóculos de las cepas HUMV 1319 y HUMV 2790 mataron al 50% de las larvas tras 72 h, y al 70 y 50% de las mismas tras 84 h, respectivamente. Ambas cepas sometidas a estrés mataron a más del 60% de las larvas tras 72 h, y hasta un 90% de las mismas la cepa HUMV 2790 tras 84 h.

f. Resistencia a suero humano

Para analizar la contribución de la adaptación al estrés a la resistencia o sensibilidad al suero humano, se emplearon 2 cepas de *A. baumannii* (se seleccionaron las mismas que para evaluar la virulencia, HUMV 1319 y HUMV 2790).

En primer lugar se comprobó la resistencia de ambas cepas al suero, hasta el 50%, comparando su supervivencia en suero normal e inactivado por calor, empleando como control positivo de sensibilidad 2 cepas de *E. coli*, cuyos resultados se muestran en la Figura 36. No se observa ninguna diferencia de supervivencia en las cepas de *A. baumannii* (Fig. 36-B) entre ambos tipos de suero a la misma condición, que sí se observa en las cepas de *E. coli* (Fig. 36-A) tras 3 h de exposición al suero humano normal (no con el suero inactivado).

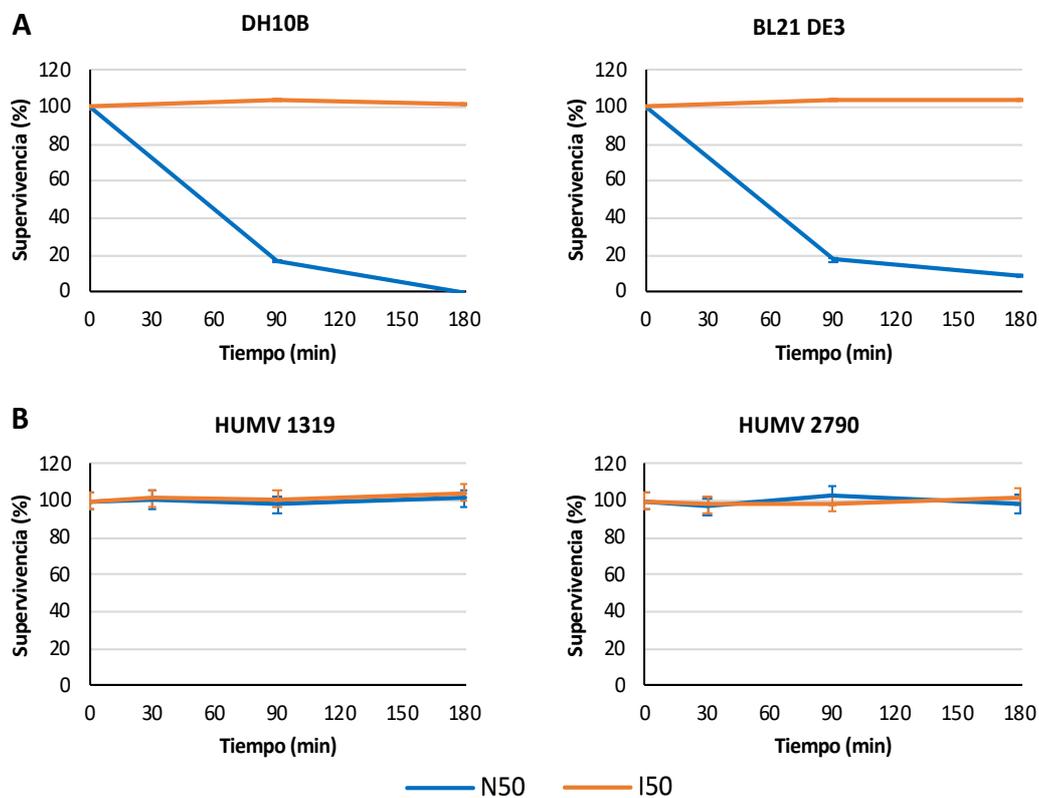


Figura 36: Efecto del suero humano en bacterias sensibles (A) y resistentes (B) al mismo. Cepas de *E. coli* usadas como control positivo de sensibilidad (A) y cepas de *A. baumannii* como control positivo de resistencia (B) expuestas a 50% de suero humano normal (N50) o inactivado por calor (I50) durante 3 horas. Los resultados mostrados son la media de 3 réplicas de 3 experimentos independientes y el error estándar (\pm SE). La leyenda muestra los distintos tipos de suero.

Posteriormente, se evaluó este comportamiento comparando la respuesta de las bacterias cuando su origen era suspensiones obtenidas de cultivo O/N en medio Luria (Fig. 37-A), de 60 días en privación de nutrientes en humedad (Fig. 37-B) o mantenidas 60 días en desecación en bata de laboratorio a RT (Fig. 37-C), empleando para ello suero humano normal e inactivado pero con dos concentraciones finales, 25 y 50%. Como se observa en la

Figura 37, ambas cepas de inóculo fresco tuvieron el mismo comportamiento y fenotipo resistente a todas las condiciones probadas. Tras el largo periodo de desecación en bata de laboratorio, ambas cepas siguieron siendo resistentes al suero humano al 25%, pero con disminución de viabilidad de la cepa HUMV 2790 a la concentración más alta. En el caso de inóculos de solución salina, no se vio ninguna diferencia en la cepa HUMV 2790, pero en el caso de la cepa HUMV 1319 se observó una reducción significativa en la viabilidad de las bacterias al ser expuestas a suero normal pero no al suero inactivado (T-test $p=0,002$).

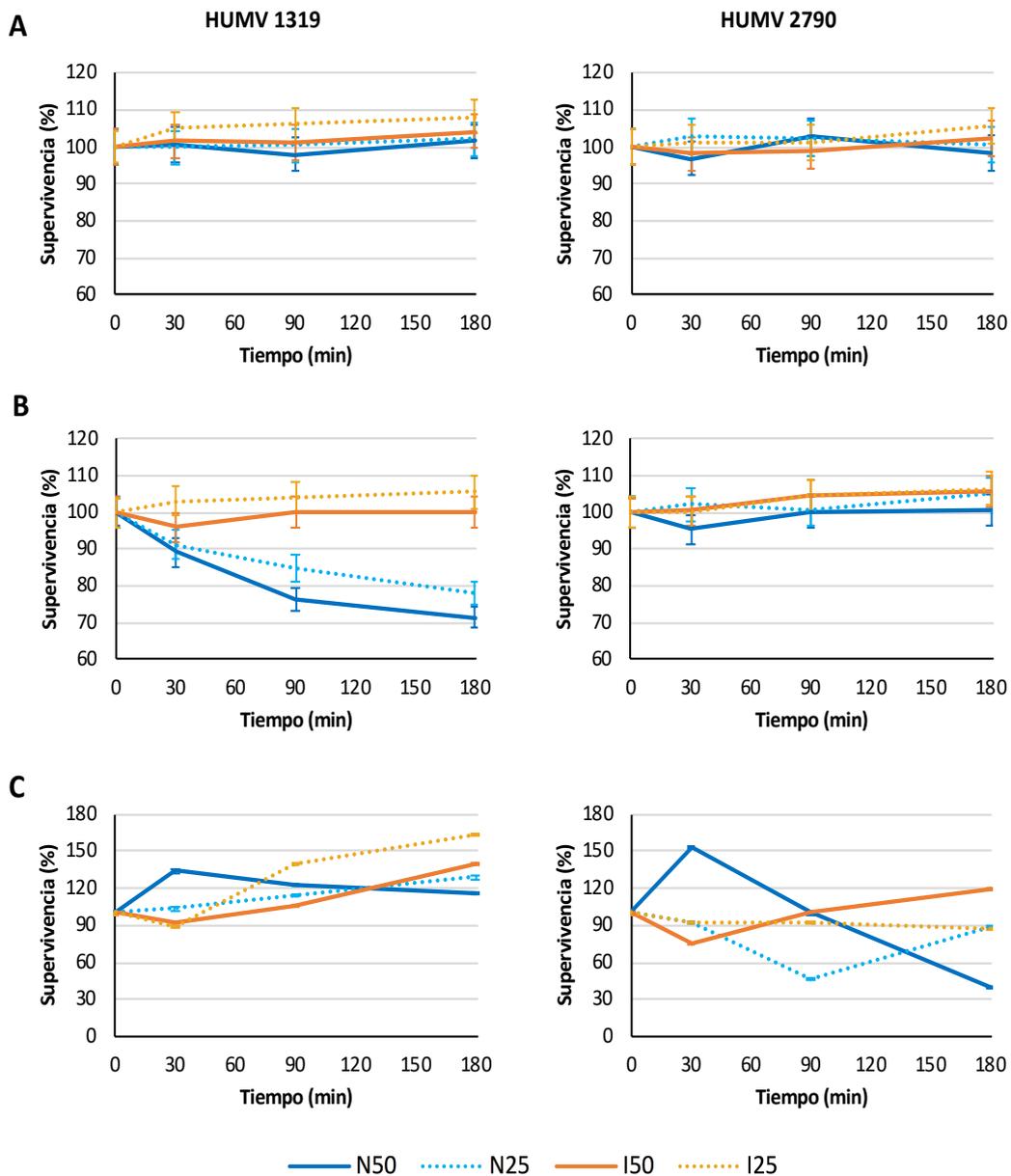


Figura 37: Efecto de condiciones de estrés en la supervivencia de *A. baumannii* en suero humano. Capacidad de supervivencia de 2 cepas de *A. baumannii* (HUMV 1319 y HUMV 2790) de inóculo fresco (A) o de 60 días en condiciones de estrés (solución salina (B) y bata de laboratorio (C)) en 50% (líneas continuas) y 25% (líneas de puntos) de suero humano normal (N50, N25) y suero humano inactivado por calor (I50, I25). Los resultados están representados como el porcentaje de supervivencia relativa suponiendo 100% al inicio, siendo la media de 3 réplicas independientes y el error estándar (\pm SE) en cada punto. La leyenda muestra los distintos tipos de suero y sus concentraciones finales.

g. Microscopía electrónica de barrido

Se examinaron fragmentos de bata de algodón inoculados con bacterias (*A. baumannii* ATCC 19606) mediante SEM para estudiar la morfología de la adherencia bacteriana a dicha superficie (Figura 38). Las imágenes de SEM mostraron algunas células con una ligera alteración de su morfología tras largo periodo de desecación y privación de nutrientes (Fig. 38-e y Fig. 38-f), comparadas con las muestras más frescas (Fig. 38-c y Fig. 38-d). Las bacterias parecen estar firmemente adheridas a las fibras de algodón del tejido incluso tras varios procesos de lavado y deshidratación en etanol durante el procesado de las muestras.

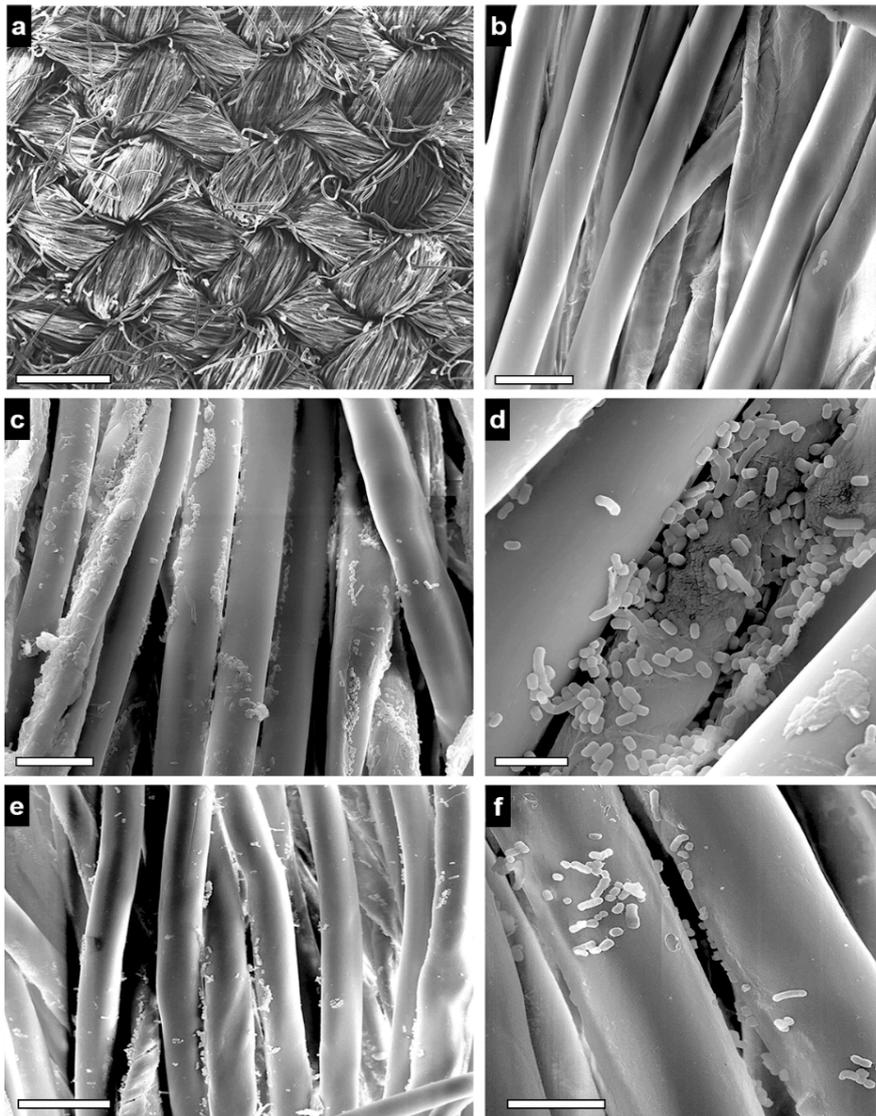


Figura 38: Análisis SEM de *A. baumannii* sobre bata de laboratorio. Análisis de SEM de la morfología de la cepa ATCC 19606 de *A. baumannii* sobre fragmentos de bata de laboratorio hasta 60 días. Los paneles muestran campos aleatorios de microscopía observados a diferentes aumentos. a-b, muestras control; c-d, muestras infectadas al inicio del experimento (día 0); e-f, muestras infectadas tras 60 días a 22°C. Magnificaciones originales: a, $\times 100$; b-c,e, $\times 2500$; d, $\times 10000$; f, $\times 5000$. Barras de escala: a, 0,5 mm; b, 20 μm ; c,e, 25 μm ; d, 5 μm ; f, 10 μm .

4. Identificación de plásmidos

La identificación de plásmidos en las cepas de este trabajo se llevó a cabo de diversas formas, tanto moleculares como bioinformáticas.

a. PFGE

Se analizó el perfil PFGE de las 11 cepas de *Acinetobacter* citadas en la Tabla 3, cuyo resultado se muestra en la Figura 39. En 6 de las cepas se identificaron plásmidos inequívocamente: HUMV 2471, HUMV 2790, HUMV 3743, HUMV 0315, HUMV 6207 y HUMV 6483. Las cepas que no presentan ninguna banda positiva pueden carecer de plásmido o tenerlos de un tamaño demasiado pequeño para ser detectados. Ninguna de las cepas positivas mostró el mismo perfil. En las 3 cepas de *A. baumannii* y en la cepa de *A. pittii* HUMV 0315 se detectaron 2 plásmidos, uno de más de 97 kb y otro de más de 48,5 kb. En las otras 2 cepas de *A. pittii* solo se identificó 1 plásmido, de tamaño superior a 97 kb.

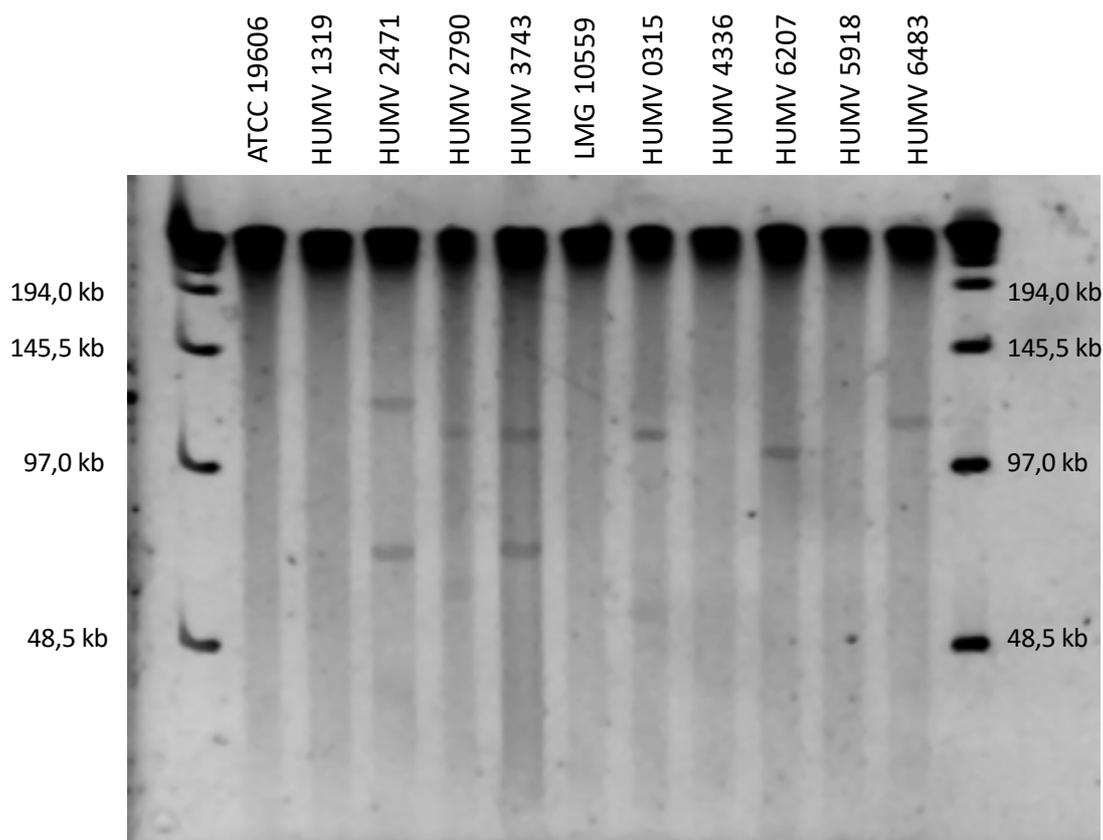


Figura 39: Perfil PFGE de *Acinetobacter*. Incluidas las 5 cepas de *A. baumannii* y las 6 cepas de *A. pittii* descritas en la Tabla 3. Se identificaron plásmidos en 3 cepas de *A. baumannii* y en 3 de *A. pittii*.

b. PCR

Mediante PCR con *primers* específicos diseñados para identificar plásmidos de *A. baumannii* se encontraron dichas estructuras en todas las cepas de *A. baumannii* y en 1 de las cepas de *A. pittii*, como se muestra en la Figura 40. La cepa de referencia ATCC 19606 fue positiva para plásmido de grupo 8; las cepas clínicas HUMV 1319, HUMV 2471 y HUMV 2790 para plásmidos del grupo 2; la cepa HUMV 3743 para el grupo 6; y la cepa HUMV 0315 de *A. pittii* para plásmido del grupo 3.

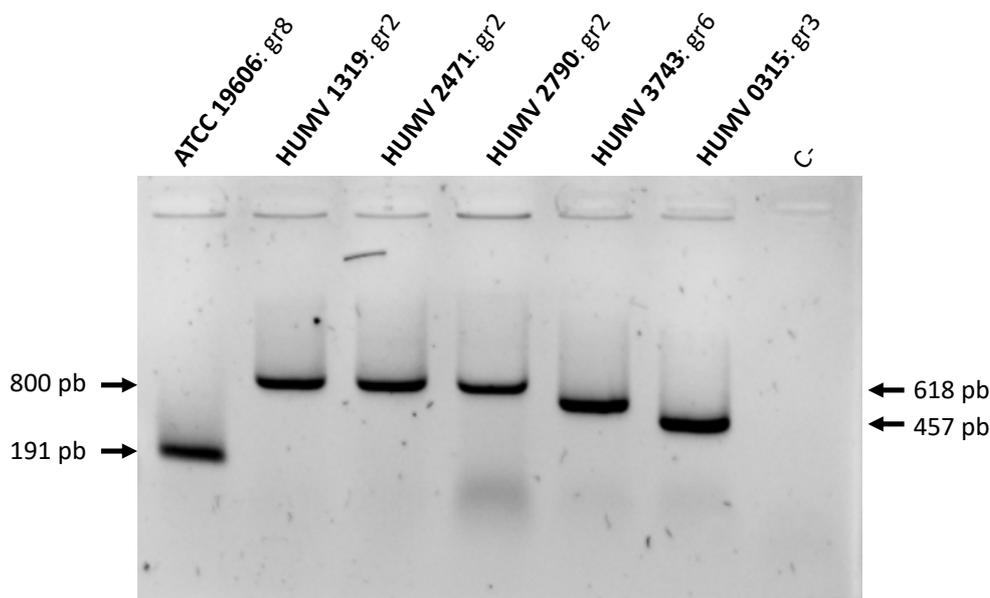


Figura 40: Productos de PCR de plásmidos de *Acinetobacter*. El tamaño de los productos fue el siguiente: ATCC 19606, 191 pb; HUMV 1319, 800 pb; HUMV 2471, 798 pb; HUMV 2790, 799 pb; HUMV 3743, 618 pb; HUMV 0315, 457 pb.

c. Secuenciación PacBio

La secuenciación PacBio de las cepas (HUMV 4336, HUMV 6207, HUMV 5918 y HUMV 6483) de *A. pittii*, identificó plásmidos en las cepas HUMV 6207 y HUMV 6483, y ninguno en las cepas HUMV 4336 y HUMV 5918, las cuales tras análisis posteriores se vio que solo variaban en la presencia de un gen.

En el caso de la cepa HUMV 6207, el ensamblaje resultó en un cromosoma de 3,94 Mb y un plásmido de 100,37 kb. En el caso de la cepa HUMV 6483, se identificaron un cromosoma de 4,07 Mb y un único plásmido de 112,60 kb.

d. PLACNET

Mediante el software PLACNET se analizaron 10 cepas secuenciadas mediante tecnología Illumina, 6 cepas de *A. baumannii* y 4 de *A. pittii*. El programa detectó al menos un plásmido en todas ellas, a excepción de la cepa clínica de *A. pittii* HUMV 4336, como sucedió con la secuenciación PacBio.

En las reconstrucciones que se muestran a continuación se han resaltado los nodos que corresponden al cromosoma en verde, los que corresponden a los plásmidos en azul y en rojo las nubes consideradas como “posibles plásmidos”, ya que si bien el programa los agrupa de manera independiente no tienen suficiente homología con las secuencias de referencia para poder afirmar que lo son. También es posible que algunas de las nubes que el programa mantiene separadas formen parte del mismo plásmido, pero se muestran los resultados que genera tras la depuración manual de los mismos.

La Figura 41 muestra las reconstrucciones de los genomas de *A. baumannii*, incluyendo la cepa control HUMV 3637, en los que se predijeron los siguientes componentes y tamaños:

- ATCC 19606: 1 cromosoma de 3,92 Mb, un plásmido de 15,79 kb (elevada similitud con pMAC) y 1 posible plásmido de 11 kb.
- HUMV 1319: 1 cromosoma de 3,89 Mb, un plásmido de 12,97 kb y 3 posibles plásmidos de 2,7 kb (1), 4 kb (2) y 8,2 kb (3).
- HUMV 2471: 1 cromosoma de 3,79 Mb, 4 plásmidos de 6 kb (1), 8,95 kb (2) (identificado como pMMCU3), 85,9 kb (3) y 69,2 kb (4) y 1 posible plásmido (4,48 kb).
- HUMV 2790: 1 cromosoma de 3,8 Mb y 2 plásmidos de 105,1 kb (1) (elevada similitud con pABUH5-114) y 11,55 kb (2).
- HUMV 3743: 1 cromosoma de 3,88 Mb y 2 plásmidos de 32,06 kb (1) y 107,02 kb (2) (identificado como pABUH5-114).
- HUMV 3637: 1 cromosoma de 3,88 Mb y 2 plásmidos de 107,02 kb (1) (identificado como pABUH5-114) y 78,73 kb (2).

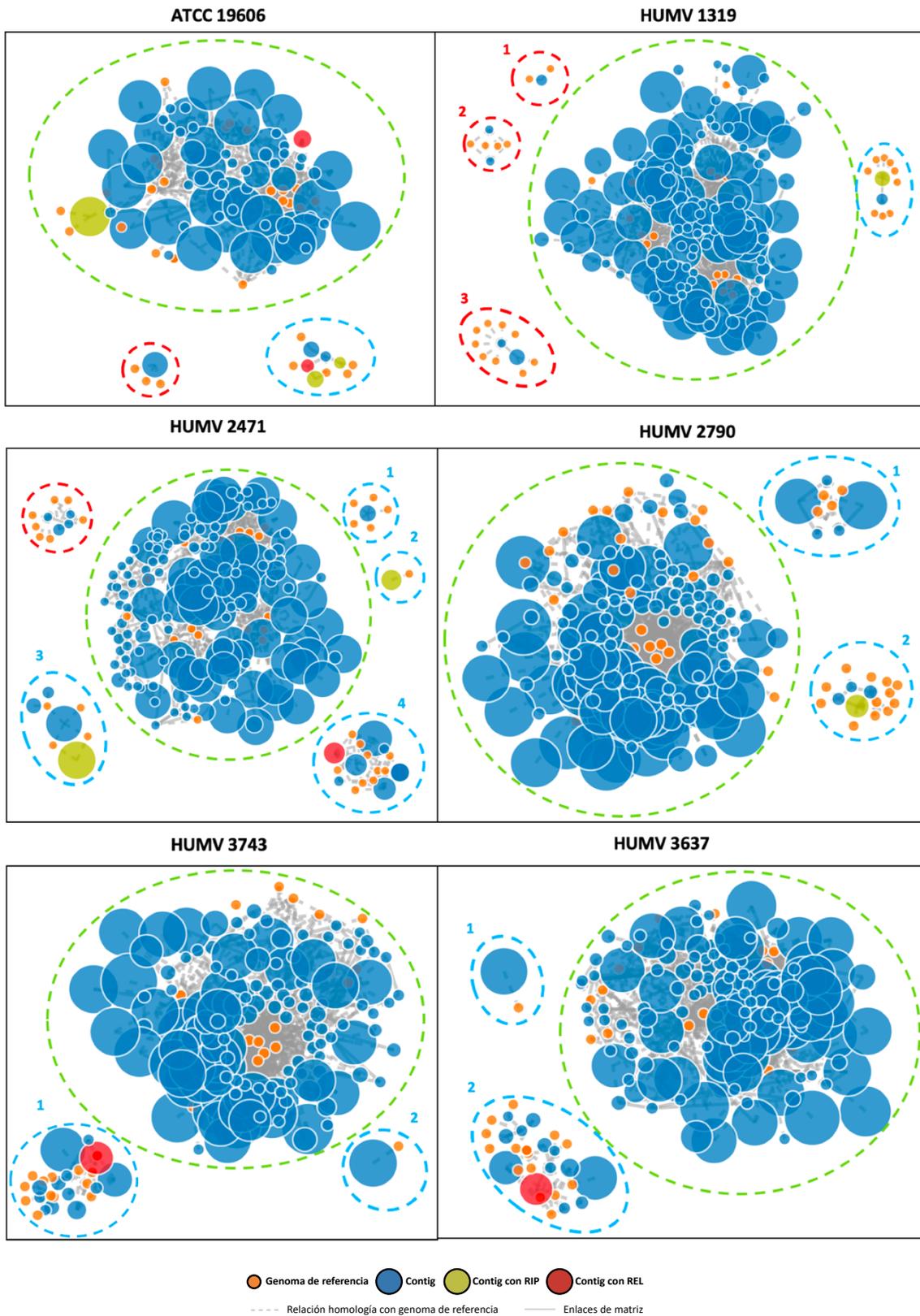


Figura 41: Reconstrucción de PLACNET de los genomas de *A. baumannii*. *Contigs* representados como nodo azul, en naranja genomas de referencia. El tamaño de los nodos de *contigs* es proporcional a la longitud del mismo, mientras que los de referencia son de tamaño fijo. Los otros nodos coloreados representan *contigs* con genes para proteínas de plásmido específicas: verde proteínas de iniciación de la replicación (RIP) y rojo con relaxasas (REL). Las líneas sólidas representan enlaces de matriz, y las punteadas homología a referencias.

La Figura 42 muestra las reconstrucciones de los genomas de *A. pittii*, en los que se predijeron los siguientes componentes y tamaños:

- HUMV 0315: 1 cromosoma de 3,9 Mb y 3 plásmidos de 115,88 kb (1), 9,33 kb (2) (identificado como pOIFC032-8.6, de *A. baumannii*) y 6,14 kb (3).
- HUMV 6207: 1 cromosoma de 3,87 Mb y 3 plásmidos de 35,72 kb (1), 59,78 kb (2) y 13,5 kb (3).
- HUMV 4336: 1 cromosoma de 3,9 Mb.
- HUMV 6483: 1 cromosoma de 3,86 Mb y 3 plásmidos de 58,97 kb (1), 35,72 kb (elevada similitud con pMS32-1) y 12,45 kb (3).

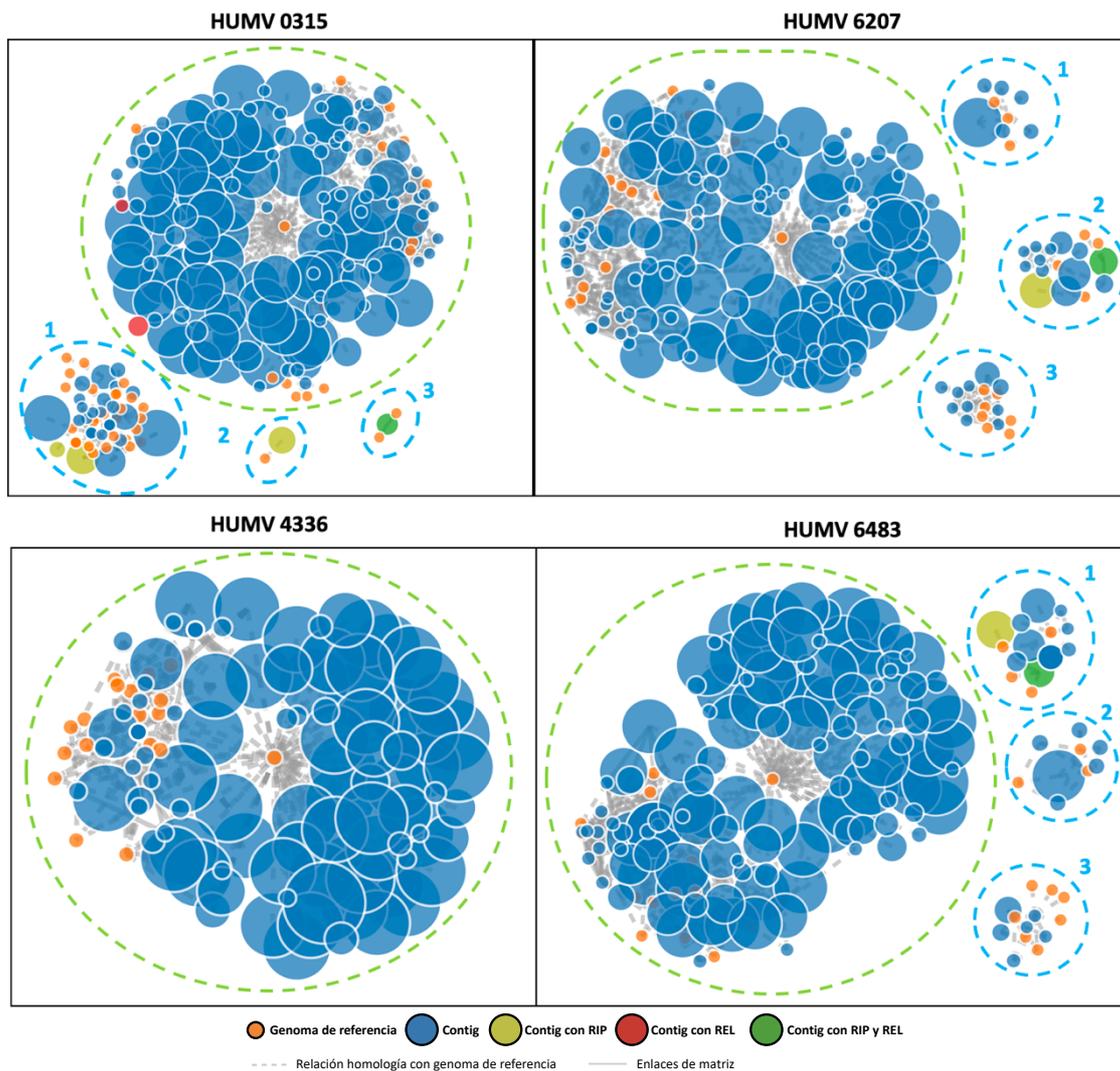


Figura 42: Reconstrucción de PLACNET de los genomas de *A. pittii*. *Contigs* representados como nodo azul, en naranja genomas de referencia. El tamaño de los nodos de *contigs* es proporcional a la longitud del mismo, mientras que los de referencia son de tamaño fijo. Los otros nodos coloreados representan *contigs* con genes para proteínas de plásmido específicas: verde claro proteínas de iniciación de la replicación (RIP), rojo con relaxasas (REL) y verde oscuro con ambas. Las líneas sólidas representan enlaces de matriz, y las punteadas homología a referencias.

5. Análisis genómico

a. Comparativa de genomas

Partiendo de los genomas de *Acinetobacter* secuenciados, tanto mediante PacBio como mediante la tecnología Illumina, se realizaron diferentes análisis para su comparación, que incluían la determinación del pan-genoma, el establecimiento de las relaciones taxonómicas y la visualización de esa comparativa.

i. Pan-genoma

Gracias al software PanOCT, se determinaron los genes ortólogos de todas las cepas secuenciadas por Illumina, pudiendo con ello definir el genoma core y el pan-genoma del género *Acinetobacter* (Figura 43), y de las especies *A. baumannii* (Figura 44-A) y *A. pittii* (Figura 44-B), individualmente. En los diagramas de Venn se muestra en el centro el número de genes que componen el genoma core así como el número de genes únicos para cada una de las cepas. Con ello se puede observar que el tamaño del genoma core disminuye conforme se aumenta el grupo de estudio.

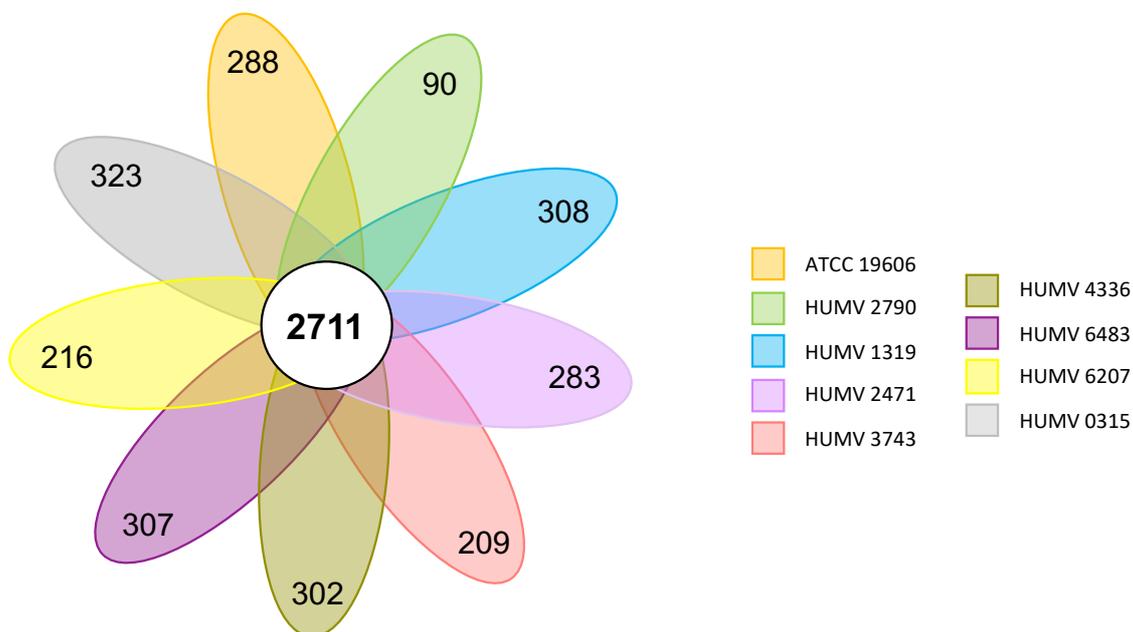


Figura 43: Composición del pan-genoma de 9 cepas de *Acinetobacter*. En el centro, sobre fondo blanco, se indica el número de genes que componen el genoma core. En cada elipse se muestra el número de genes únicos del genoma accesorio de cada cepa. El pan-genoma total fue de 6817 genes. Los genomas accesorios de genes compartidos de cada cepa tienen los siguientes tamaños: ATCC 19606 (678), HUMV 2790 (891), HUMV 1319 (659), HUMV 2471 (559), HUMV 3743 (944), HUMV 4336 (646), HUMV 6483 (745), HUMV 6207 (785), HUMV 0315 (728). La leyenda muestra las cepas incluidas.

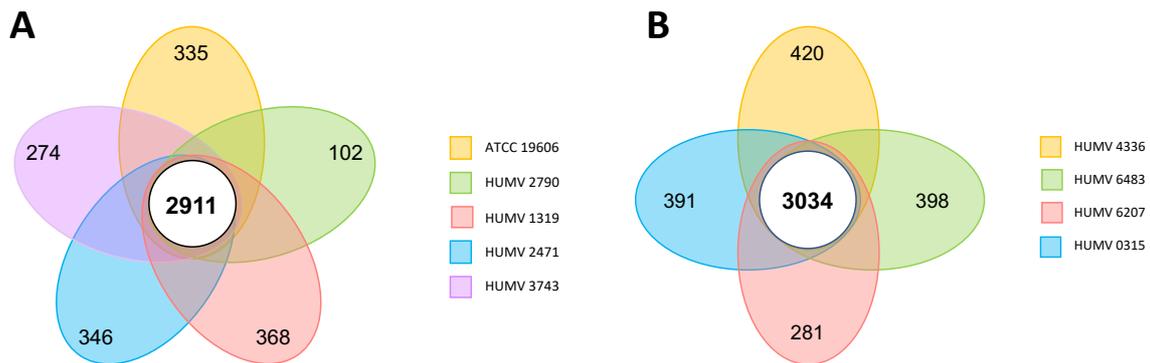


Figura 44: Composición del pan-genoma de *A. baumannii* (A) y *A. pittii* (B). En el centro, sobre fondo blanco, se indica el número de genes que componen los genomas core. En cada elipse se muestra el número de genes únicos del genoma accesorio de cada cepa.

A. El pan-genoma total de *A. baumannii* fue de 5244 genes. Los genomas accesorios de genes compartidos de cada cepa tienen los siguientes tamaños: ATCC 19606 (432), HUMV 2790 (679), HUMV 1319(402), HUMV 2471 (296), HUMV 3743 (679).

B. El pan-genoma total de *A. pittii* fue de 5046 genes. Los genomas accesorios de genes compartidos de cada cepa tienen los siguientes tamaños: HUMV 4336 (205), HUMV 6483 (331), HUMV 6207 (396), HUMV 0315 (339). La leyenda muestra las cepas incluidas.

A continuación se utilizó el software PanGP para representar los perfiles del pan-genoma, estableciendo la relación entre el tamaño del mismo y del genoma core (Figura 45). En este caso puede verse de un modo más visual como se relacionan inversamente el tamaño del pan-genoma con el del genoma core de cada conjunto; así como el primero aumenta de una manera directa con el número muestral, el segundo lo hace de manera inversa. En la Fig. 45-B puede observarse la tendencia de disminución de la cantidad de genes únicos al aumentar el tamaño del grupo a comparar.

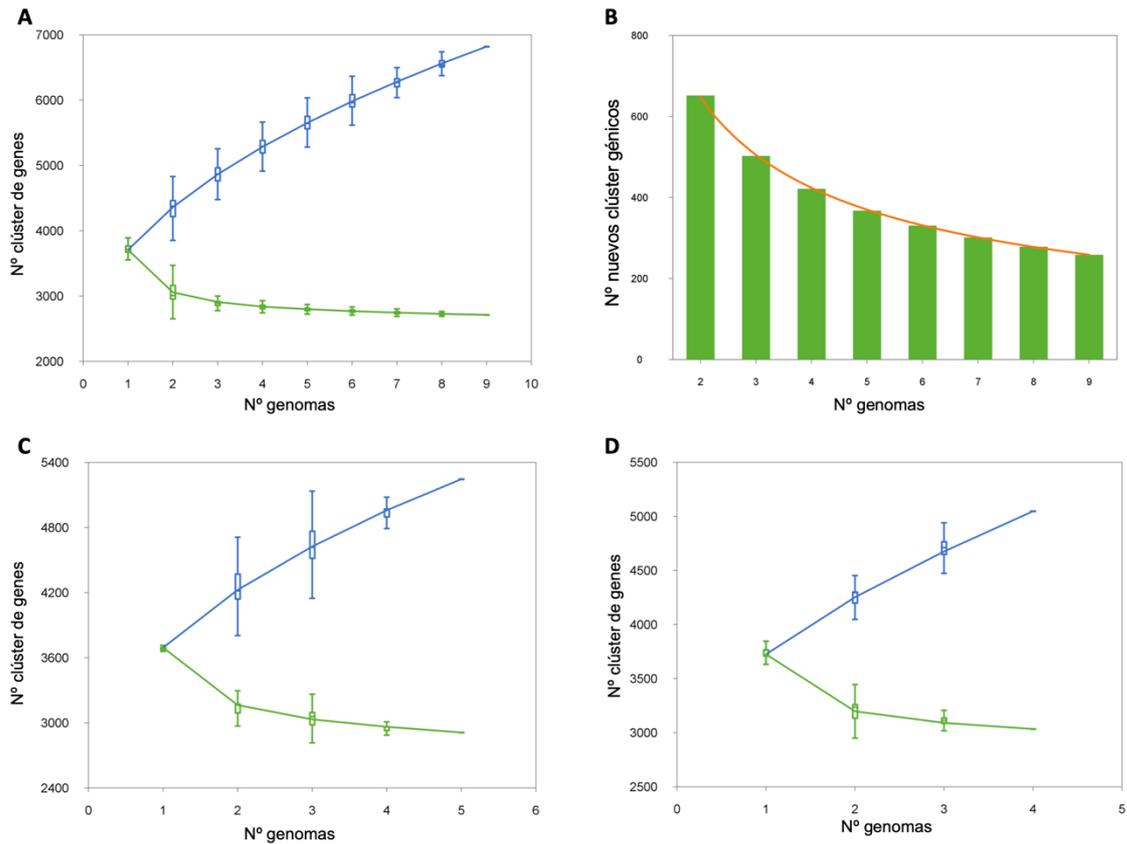


Figura 45: Representación PanGP de perfiles de pan-genoma.

A y B pan-genoma de *Acinetobacter* sp.; C, *A. baumannii*; D, *A. pittii*.

En A, B y C, en azul el tamaño del pan-genoma y en verde el tamaño del genoma core.

ii. Relación taxonómica

Para establecer la relación taxonómica entre las cepas, se realizaron árboles filogenéticos con el gen codificante del ARNr 16S y se calcularon las distancias ANI y DDH para todo el conjunto. En ambos casos se emplearon 2 cepas de referencia accesibles en GenBank como controles, una de cada especie.

- Árboles filogenéticos

Para dibujar los árboles filogenéticos se empleó el software MEGA y se trazaron utilizando el método Maximum Likelihood con 500 réplicas. Se empleó la cepa AYE como control de la especie *A. baumannii* y la cepa PHEA-2 para *A. pittii*.

La Figura 46 muestra el resultado al emplear todas las cepas del género, estando perfectamente clara la división entre las dos especies. Del mismo modo puede observarse como dentro de ambos grupos existen cepas más cercanas entre ellas que otras. Esta cercanía también puede observarse más detalladamente en la Figura 47 para los conjuntos de cepas de *A. baumannii* (Fig. 47-A) y *A. pittii* (Fig. 47-B). En el primer conjunto se observa mayor cercanía entre las cepas HUMV 2790 y HUMV 3743. En el segundo grupo la similitud mayor la exhiben las cepas HUMV 4336 y HUMV 5918. En ambos casos se incluyó la cepa de referencia obtenida en GenBank de la especie contraria como control del análisis.

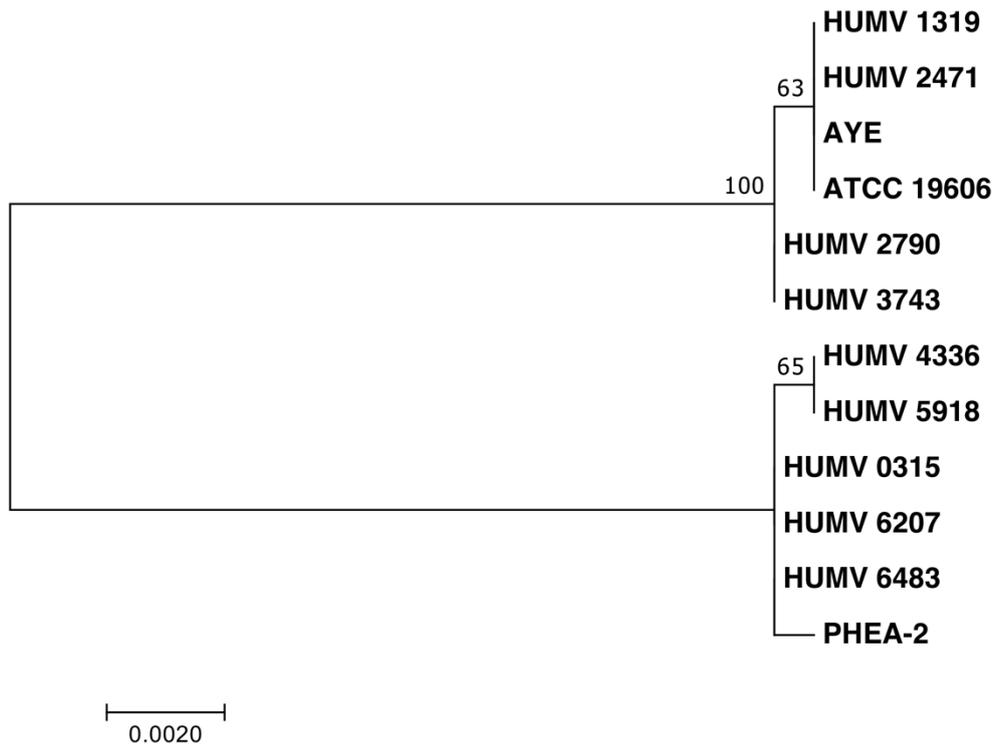


Figura 46: Árbol filogenético del género *Acinetobacter*.

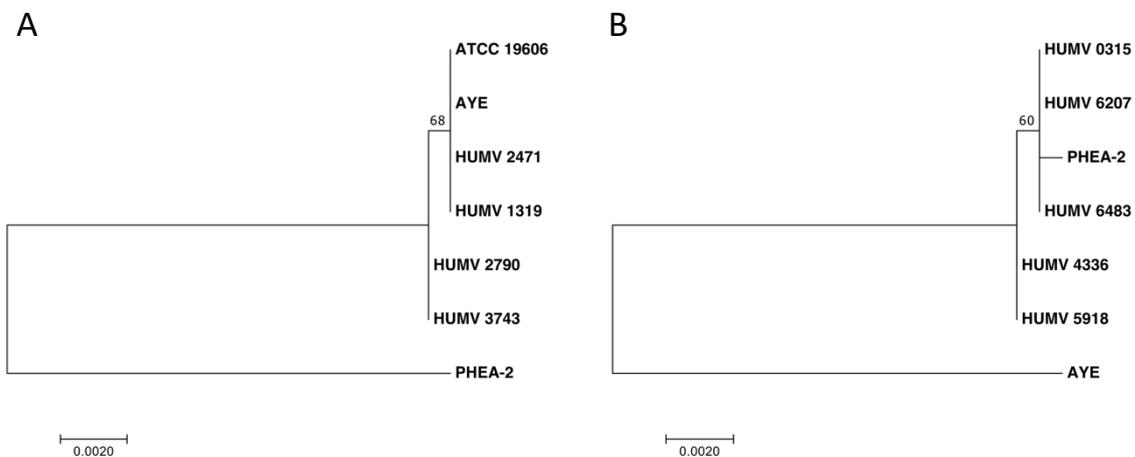


Figura 47: Árboles filogenéticos de las especies *A. baumannii* (A) y *A. pittii* (B). A, Incluida la cepa de referencia de *A. pittii* PHEA-2. B, Incluida la cepa de referencia de *A. baumannii* AYE.

- ANI y DDH

Se calcularon las distancias ANI y DDH entre todas las cepas de *Acinetobacter*, incluidas las 2 cepas de referencia para dibujar la matriz que se muestra en la Figura 48. En ella, la parte superior corresponde a los valores ANI, mientras que la parte inferior son los valores DDH. En el primer caso, se toman los valores >95% como identificativos de pertenecer a la misma especie; mientras que este valor desciende a >70% en el caso de DDH.

Se encuentran perfectamente diferenciadas las 2 especies, sombreadas en rosa. Como en el caso anterior, se observa que las parejas de cepas HUMV 2790 - HUMV 3743 y HUMV 4336 - HUMV 5918, presentan mayor similitud entre ellas que con el resto del conjunto.

| | AYE | ATCC 19606 | HUMV 1319 | HUMV 2471 | HUMV 2790 | HUMV 3743 | HUMV 0315 | HUMV 4336 | HUMV 6207 | HUMV 5918 | HUMV 6483 | PHEA-2 | |
|------|------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------|------------|
| 100 | 98 | 98 | 98 | 98 | 98 | 88 | 88 | 88 | 88 | 88 | 88 | 88 | AYE |
| 84,4 | 100 | 98 | 98 | 98 | 98 | 88 | 88 | 88 | 88 | 88 | 88 | 88 | ATCC 19606 |
| 90,1 | 86,9 | 100 | 98 | 98 | 98 | 88 | 88 | 88 | 88 | 88 | 88 | 88 | HUMV 1319 |
| 79,1 | 83,3 | 83,8 | 100 | 98 | 98 | 88 | 88 | 88 | 88 | 88 | 88 | 88 | HUMV 2471 |
| 84,0 | 85,7 | 85,8 | 79,6 | 100 | 100 | 88 | 88 | 88 | 88 | 88 | 88 | 88 | HUMV 2790 |
| 80,1 | 83,3 | 83,1 | 78,4 | 96,8 | 100 | 88 | 88 | 88 | 88 | 88 | 88 | 88 | HUMV 3743 |
| 59,4 | 61,0 | 60,6 | 59,4 | 56,9 | 56,5 | 100 | 96 | 97 | 96 | 97 | 96 | 96 | HUMV 0315 |
| 60,3 | 61,9 | 61,9 | 60,9 | 60,1 | 59,5 | 78,8 | 100 | 96 | 100 | 96 | 96 | 96 | HUMV 4336 |
| 61,3 | 62,3 | 61,2 | 63,2 | 59,0 | 58,0 | 85,9 | 82,6 | 100 | 96 | 97 | 96 | 96 | HUMV 6207 |
| 60,8 | 62,0 | 61,9 | 60,8 | 60,3 | 59,5 | 78,8 | 99,9 | 82,5 | 100 | 96 | 96 | 96 | HUMV 5918 |
| 58,2 | 59,5 | 58,6 | 59,8 | 57,9 | 58,8 | 82,8 | 79,4 | 84,4 | 79,4 | 100 | 96 | 96 | HUMV 6483 |
| 61,6 | 64,5 | 63,4 | 63,0 | 62,0 | 60,8 | 80,2 | 88,8 | 83,5 | 88,7 | 81,1 | 100 | 100 | PHEA-2 |

Figura 48: Matriz de distancia evolutiva entre cepas de *Acinetobacter*. Parte superior de la matriz corresponde a valores ANI; parte inferior a valores DDH. ANI >95% y DDH >70% definen misma especie. Diagonal central 100% para la misma cepa.

iii. Visualización de genomas

Se empleó el software BRIG para obtener la reconstrucción y comparativa de los genomas de las cepas de *Acinetobacter* analizadas. Para ello se emplearon las cepas AYE y PHEA-2 como cepa de referencia, ya que se obtienen mejores resultados al emplear genomas completamente cerrados.

En la Figura 49 se muestra la comparativa de las 6 cepas de *A. baumannii* y las 6 de *A. pittii* juntas, donde puede observarse una gran similitud existente entre ambas especies. En la Figura 50 se muestra de manera más detallada la comparativa entre las cepas de *A. baumannii*, utilizando como referencia la cepa AYE (Fig. 50-A); y para las cepas de *A. pittii* usando como referencia en este caso la cepa PHEA-2 (Fig. 50-B).

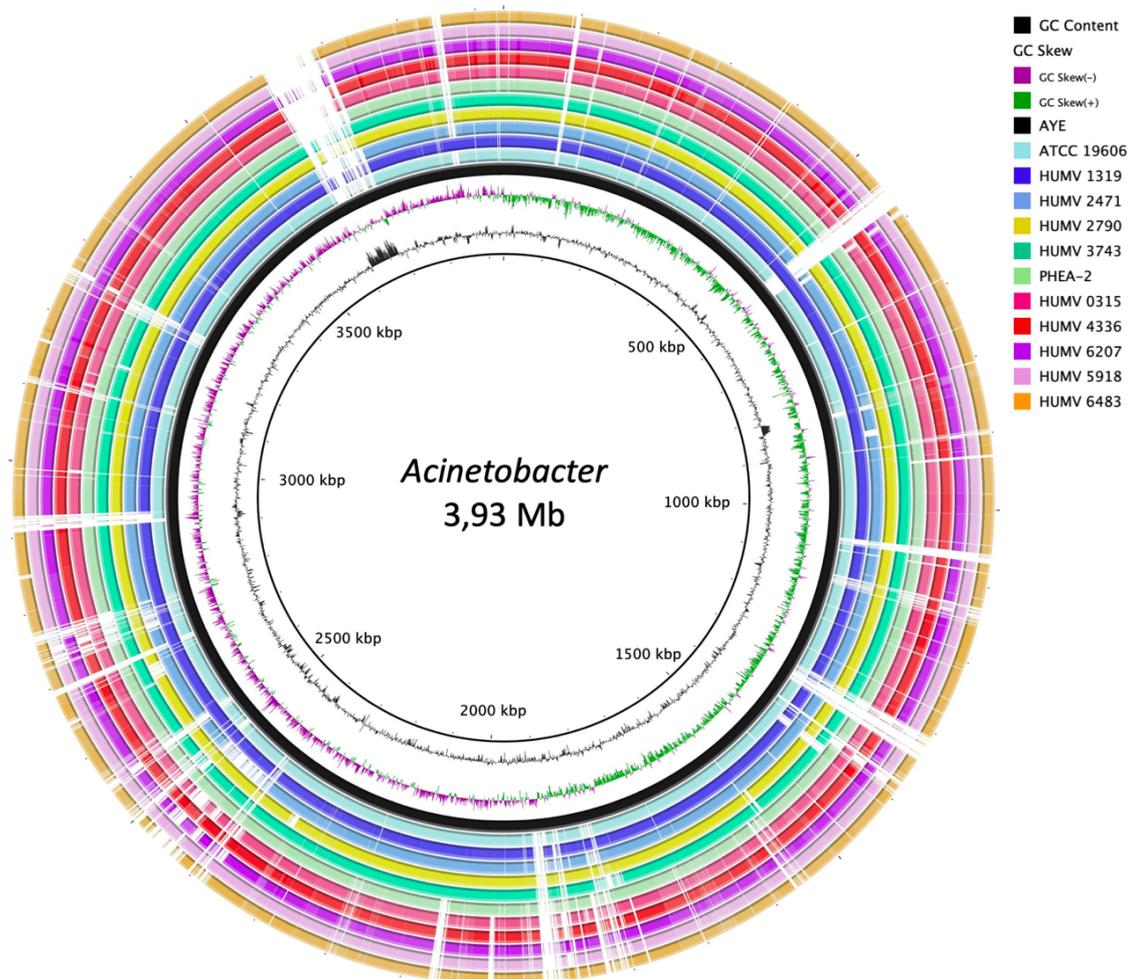


Figura 49: Comparativa de genomas circulares de *Acinetobacter*. La leyenda muestra la colección de cepas incluidas y el contenido en GC.

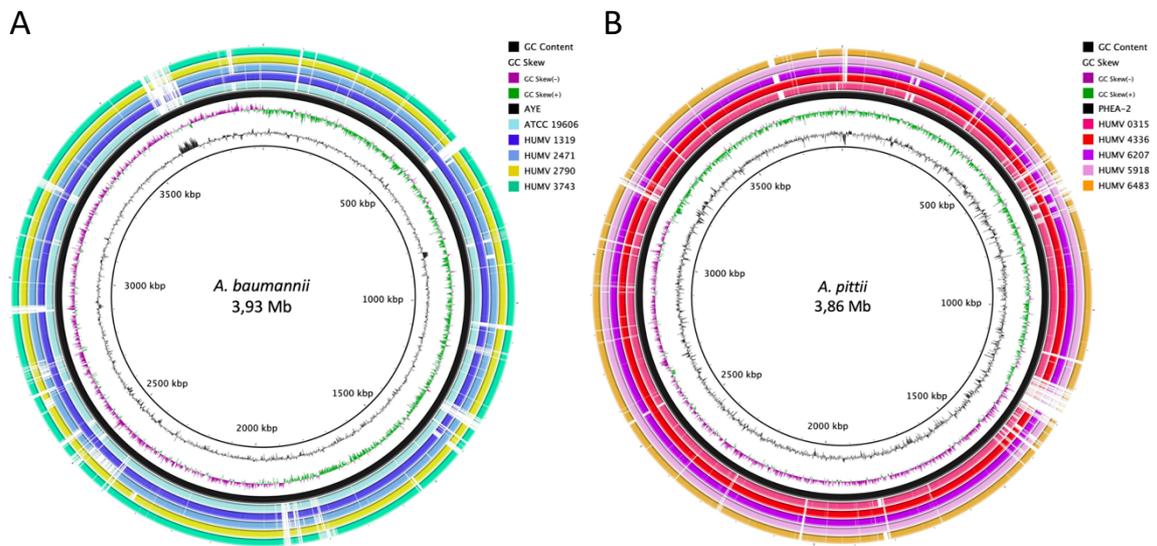


Figura 50: Comparativa de genomas circulares de *A. baumannii* (A) y *A. pittii* (B). En A, se usó como cepa de referencia la cepa de *A. baumannii* AYE; y en B, la cepa de *A. pittii* PHEA-2. Las leyendas muestran la colección de cepas incluidas y el contenido en GC.

b. Anotación de genomas y subsistemas

Mediante el software online RAST se obtuvo la anotación y distribución de genes en subsistemas de las cepas de *Acinetobacter* secuenciadas. En la Figura 51 se muestra la distribución en subsistemas de cada una de las cepas de *A. baumannii*, con el número de genes correspondientes a cada uno. Del mismo modo, en la Figura 52 se recoge dicha información de las cepas de *A. pittii*. En todos los casos, el número de genes incluidos en subsistemas está en torno al 50%, los no incluidos en su mayoría definidos como “hipotéticos”.

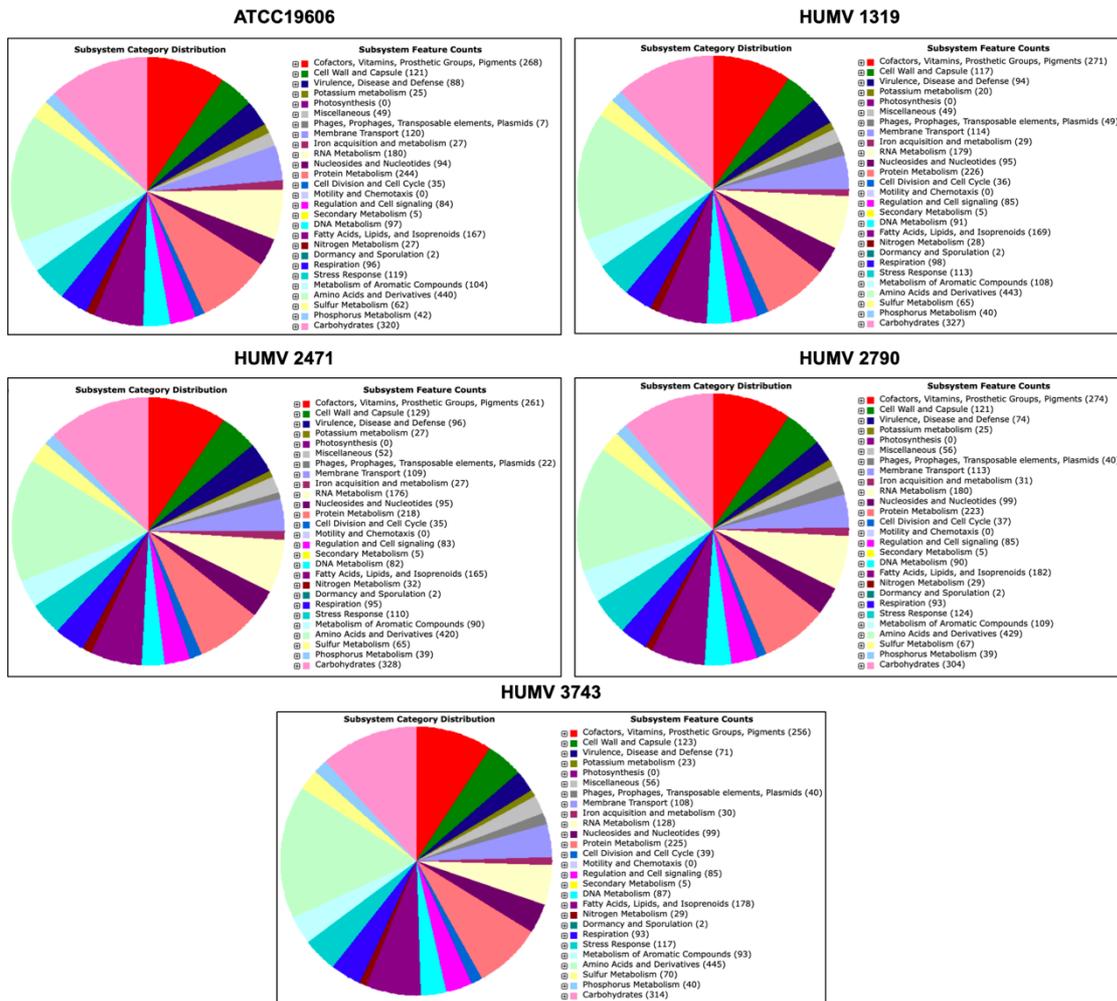


Figura 51: Distribución de genes de 5 cepas de *A. baumannii* en subsistemas.

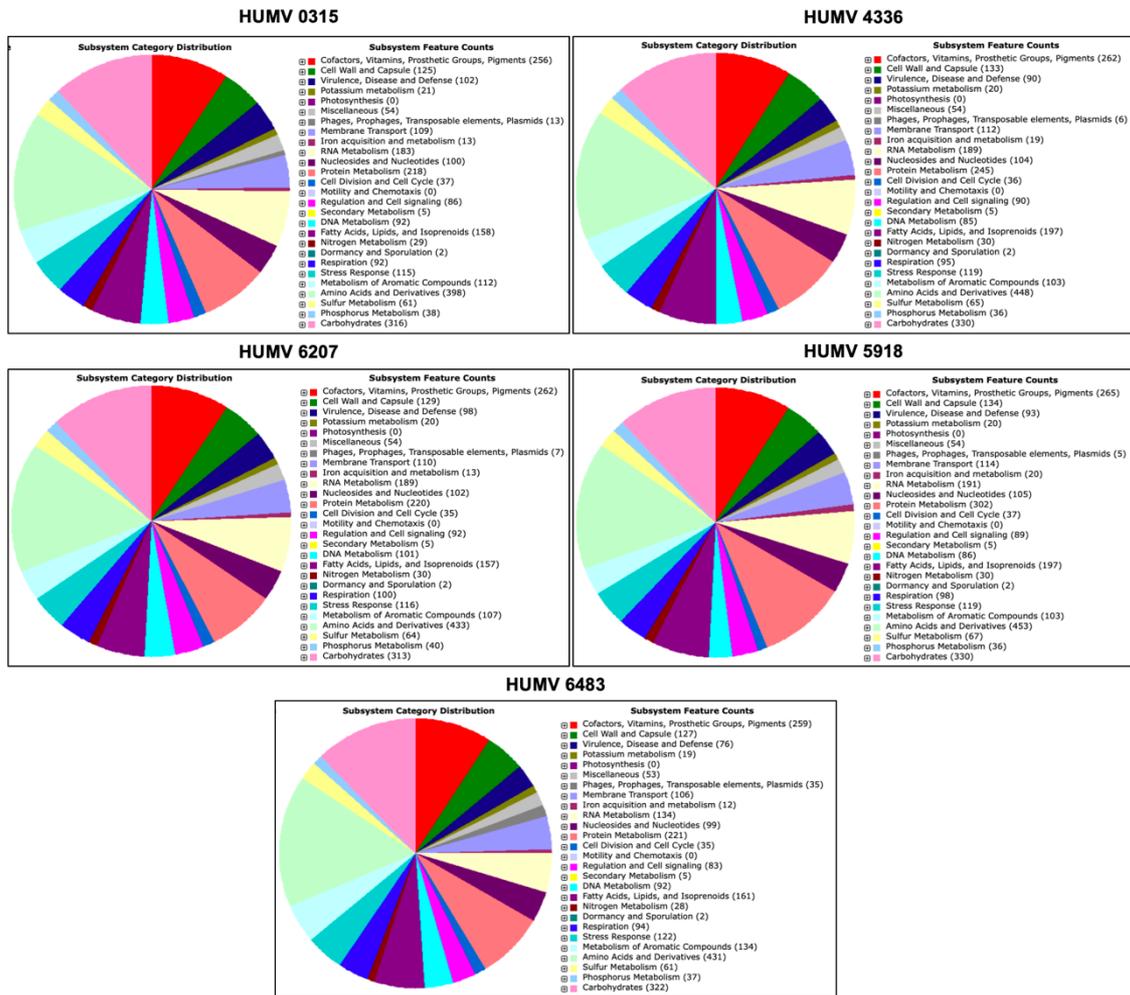


Figura 52: Distribución de genes de 5 cepas de *A. pittii* en subsistemas.

La Figura 53 recoge el número medio de genes distribuidos en cada subsistema para *A. baumannii* (A), *A. pittii* (B) y *Acinetobacter* spp. (C). En todos los casos el mayor número corresponde a genes relacionados con el metabolismo o con componentes celulares, observándose una distribución muy similar en todos los casos.

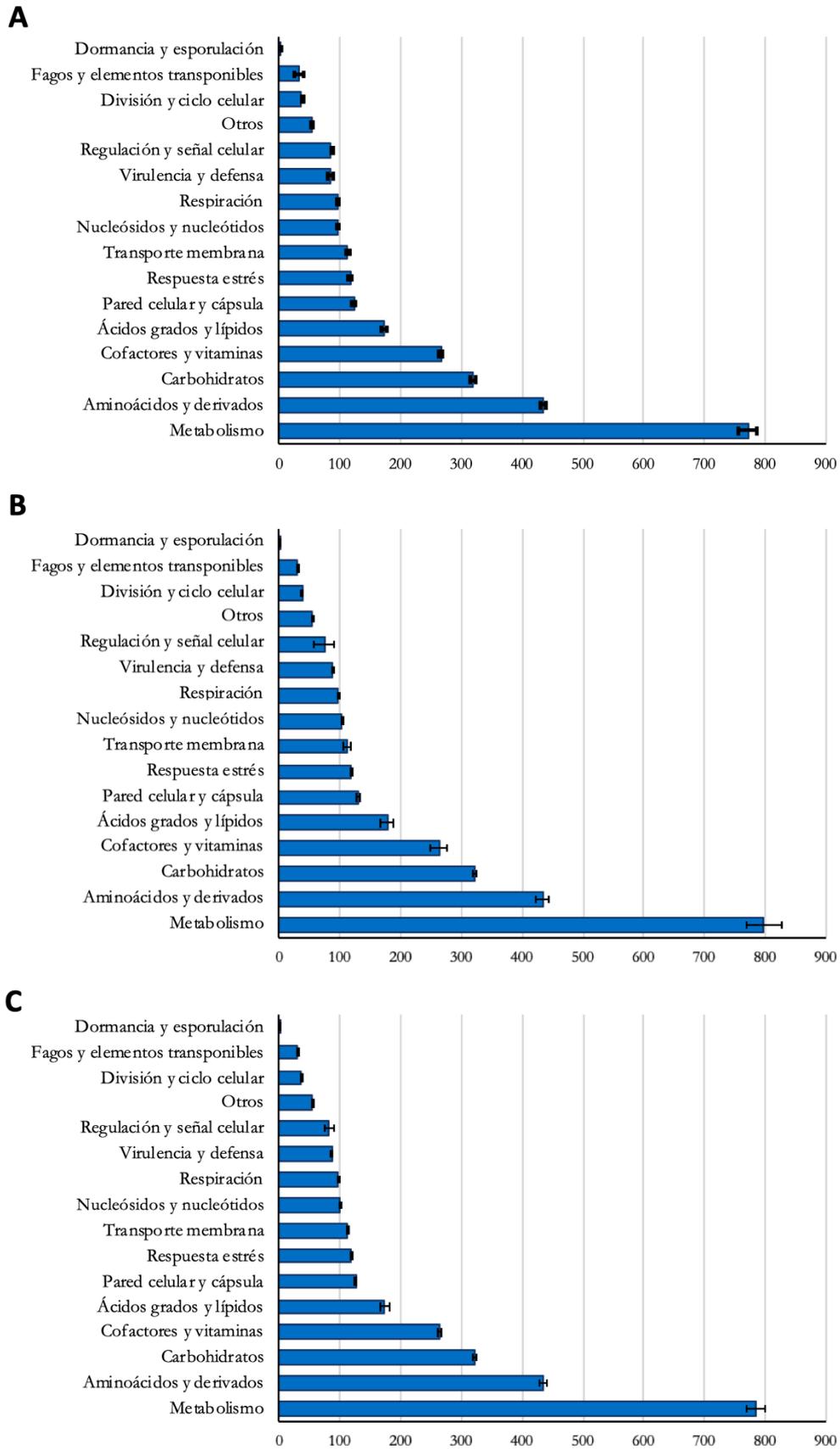


Figura 53: Distribución de genes en subsistemas. Cada barra muestra la media de los genes de cada cepa de *A. baumannii* (A), *A. pittii* (B) o *Acinetobacter* spp. (C) en cada subsistema y el error estándar (\pm SE) de cada una.

c. Determinantes de resistencia

Dada la gran importancia de *Acinetobacter* como patógeno multirresistente, se llevó a cabo la identificación de determinantes de resistencia en los genomas secuenciados, tanto la identificación de genes codificantes para enzimas modificadoras o bombas de expulsión como el mapeo de mutaciones puntuales en genes asociados con la resistencia antibiótica.

i. Identificación de genes

Con los genomas secuenciados y anotados, se realizó la búsqueda de genes asociados con la resistencia antibiótica empleando para ello el software *abricate* y la base de datos CARD.

En la Tabla 18 se muestran los genes codificantes para enzimas modificadoras de aminoglucósidos, β -lactamasas (clase C y clase D) y de resistencia a sulfonamidas, identificados en las cepas de *A. baumannii*. Del mismo modo, se recogen los genes que codifican para distintas bombas de expulsión así como los genes de proteínas reguladoras de la expresión de las mismas. Todas las cepas portan al menos un gen *bla*_{OXA-51}, gen descrito como intrínseco de este grupo de bacterias. También es común en las 5 la presencia de las bombas RND AdeABC, AdeFGH y AdeIJK, si bien algunas cepas carecen de la subunidad AdeC en el primer conjunto (ATCC 19606 y HUMV 2471). El contenido y número de EMAs es muy variable entre las cepas analizadas.

| | Amino-glucósidos | β -lactámicos | | Sulfo-namidas | Bombas de expulsión | | | | |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|---------------------------------------|---------------|-------------------------------------------------|--------------|-------------|-------------|--------------------------------------------|
| | | ampC | OXA | | RND | MFS | SMR | MATE | Reguladores |
| ATCC 19606 | <i>ant(3'')-IIa</i> | ADC-2 | OXA-51 (98) OXA-51 (386) | <i>sul</i> | <i>adeAB</i> <i>adeFGH</i> <i>adeIJK</i> | | <i>abeS</i> | <i>abeM</i> | <i>adeL</i> <i>adeN</i> <i>adeRS</i> |
| HUMV 1319 | <i>aac(6')-Ib'</i> <i>aac(6')-Ib7</i> <i>ant(2'')-Ia</i> <i>ant(3'')-IIa</i> <i>aph(3')-VI</i> <i>aph(3')-VIIa</i> | ADC-7 | OXA-24 OXA-51 (71) OXA-51 (385) | <i>sul</i> | <i>adeABC</i> <i>adeFGH</i> <i>adeIJK</i> | | <i>abeS</i> | <i>abeM</i> | <i>adeL</i> <i>adeN</i> <i>adeRS</i> |
| HUMV 2471 | <i>ant(2'')-Ia</i> <i>ant(3'')-IIa</i> | ADC-39 | OXA-24 OXA-51 (98) OXA-51 (386) | | <i>adeAB</i> <i>adeFGH</i> <i>adeIJK</i> | <i>tet.A</i> | <i>abeS</i> | <i>abeM</i> | <i>adeL</i> <i>adeN</i> <i>adeR</i> |
| HUMV 2790 | <i>ant(3'')-IIa</i> <i>aph(3'')-Ib</i> <i>aph(6)-Id</i> | ADC-25 | OXA-51 (66) OXA-51 (109) | <i>sul</i> | <i>adeABC</i> <i>adeFGH</i> <i>adeIJK</i> | <i>tet.A</i> | <i>abeS</i> | <i>abeM</i> | <i>adeL</i> <i>adeN</i> <i>adeRS</i> |
| HUMV 3743 | <i>aac(3)-IIa</i> <i>ant(3'')-IIa</i> <i>aph(3'')-Ib</i> <i>aph(3')-VIIa</i> <i>aph(6)-Id</i> | ADC-25 | OXA-51 (66) OXA-51 (109) | | <i>adeABC</i> <i>adeFGH</i> <i>adeIJK</i> | <i>tet.A</i> | <i>abeS</i> | <i>abeM</i> | <i>adeL</i> <i>adeN</i> <i>adeRS</i> |

Tabla 18: Genes determinantes de resistencia antibiótica de *A. baumannii*. En genes OXA se muestra entre paréntesis la variante alélica.

La Tabla 19, por su parte, muestra los genes codificantes para determinantes de resistencia y bombas de expulsión identificados en los genomas de las cepas de *A. pittii*. En este conjunto, solo la cepa clínica HUMV 6483 mostró la presencia de un gen codificante para EMA. Todas las cepas presentaron un gen codificante de β-lactamasa de clase C (*ampC*) y varios genes de oxacilinasas, siendo el alotipo más común la forma OXA-325. Todas las cepas portaron los genes codificantes para las bombas de sustrato específico AbeS y AbeM, y las bombas tripartitas de expulsión múltiple AdeFGH y AdeIJK.

| | Amino-glucósidos | β-lactámicos | | Bombas de expulsión | | | |
|-----------|---------------------|--------------|----------------------------------------|------------------------------------------------|-------------|-------------|----------------------------|
| | | ampC | OXA | RND | SMR | MATE | Reguladores |
| HUMV 0315 | | ADC-18 | OXA-58 OXA-58 (97) OXA-213 (325) | <i>adeAB</i> <i>adeFGH</i> <i>adeIJK</i> | <i>abeS</i> | <i>abeM</i> | <i>adeL</i> <i>adeN</i> |
| HUMV 4336 | | ADC-25 | OXA-213 (325) OXA-213 (421) | <i>adeAB</i> <i>adeFGH</i> <i>adeIJK</i> | <i>abeS</i> | <i>abeM</i> | <i>adeL</i> <i>adeN</i> |
| HUMV 6207 | | ADC-43 | OXA-213 (325) OXA-213 (421) | <i>adeFGH</i> <i>adeIJK</i> | <i>abeS</i> | <i>abeM</i> | <i>adeN</i> |
| HUMV 5918 | | ADC-25 | OXA-213 (325) OXA-213 (421) | <i>adeAB</i> <i>adeFGH</i> <i>adeIJK</i> | <i>abeS</i> | <i>abeM</i> | <i>adeL</i> <i>adeN</i> |
| HUMV 6483 | <i>ant(3'')-IIa</i> | ADC-19 | OXA-213 (325) OXA-213 (421) | <i>adeAB</i> <i>adeFGH</i> <i>adeIJK</i> | <i>abeS</i> | <i>abeM</i> | <i>adeL</i> <i>adeN</i> |

Tabla 19: Genes determinantes de resistencia antibiótica de *A. pittii*. En genes OXA se muestra entre paréntesis la variante alélica.

Las Tablas 20 y 21 muestran los sustratos diana descritos de cada una de las bombas de expulsión identificadas en los genomas de *A. baumannii* y *A. pittii*, respectivamente.

| | Amino-glucósidos | β-lactámicos | Macrólidos | Tetraciclinas | Fluoro-quinolonas | Sulfonamida | Cloranfenicol |
|------------|------------------|------------------|--------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-------------|----------------------------|
| ATCC 19606 | AdeAB | AdeAB AdeIJK | AbeS AdeAB AdeIJK | AdeAB AdeFGH AdeIJK | AbeM AdeAB AdeFGH AdeIJK | AdeFGH | AdeAB AdeFGH AdeIJK |
| HUMV 1319 | AdeABC | AdeABC AdeIJK | AbeS AdeABC AdeIJK | AdeABC AdeFGH AdeIJK | AbeM AdeABC AdeFGH AdeIJK | AdeFGH | AdeABC AdeFGH AdeIJK |
| HUMV 2471 | AdeAB | AdeAB AdeIJK | AbeS AdeAB AdeIJK | AdeAB AdeFGH AdeIJK tetA | AbeM AdeAB AdeFGH AdeIJK | AdeFGH | AdeAB AdeFGH AdeIJK |
| HUMV 2790 | AdeABC | AdeABC AdeIJK | AbeS AdeABC AdeIJK | AdeABC AdeFGH AdeIJK tetA | AbeM AdeABC AdeFGH AdeIJK | AdeFGH | AdeABC AdeFGH AdeIJK |
| HUMV 3743 | AdeABC | AdeABC AdeIJK | AbeS AdeABC AdeIJK | AdeABC AdeFGH AdeIJK tetA | AbeM AdeABC AdeFGH AdeIJK | AdeFGH | AdeABC AdeFGH AdeIJK |

Tabla 20: Sustratos antibióticos de las bombas de expulsión en cepas de *A. baumannii*.

| | Amino-glucósidos | β -lactámicos | Macrólidos | Tetraciclinas | Fluoro-quinolonas | Sulfonamida | Cloranfenicol |
|------------------|------------------|---------------------|-------------------------|---------------------------|-----------------------------------|-------------|---------------------------|
| HUMV 0315 | AdeAB | AdeAB AdeIJK | AbeS AdeAB AdeIJK | AdeAB AdeFGH AdeIJK | AbeM AdeAB AdeFGH AdeIJK | AdeFGH | AdeAB AdeFGH AdeIJK |
| HUMV 4336 | AdeAB | AdeAB AdeIJK | AbeS AdeAB AdeIJK | AdeAB AdeFGH AdeIJK | AbeM AdeAB AdeFGH AdeIJK | AdeFGH | AdeAB AdeFGH AdeIJK |
| HUMV 6207 | | AdeIJK | AbeS AdeIJK | AdeFGH AdeIJK | AbeM AdeFGH AdeIJK | AdeFGH | AdeFGH AdeIJK |
| HUMV 5918 | AdeAB | AdeAB AdeIJK | AbeS AdeAB AdeIJK | AdeAB AdeFGH AdeIJK | AbeM AdeAB AdeFGH AdeIJK | AdeFGH | AdeAB AdeFGH AdeIJK |
| HUMV 6483 | AdeAB | AdeAB AdeIJK | AbeS AdeAB AdeIJK | AdeAB AdeFGH AdeIJK | AbeM AdeAB AdeFGH AdeIJK | AdeFGH | AdeAB AdeFGH AdeIJK |

Tabla 21: Sustratos antibióticos de las bombas de expulsión en cepas de *A. pittii*.

ii. Identificación secuencias de inserción

Se empleó la herramienta ISfinder para identificar secuencias de inserción en los genomas secuenciados. Si bien no se detectaron en todos los genomas, se obtuvieron las siguientes predicciones:

- HUMV 1319: elevada homología con IS*Pa42*, de la familia Tn3 de *P. aeruginosa*.
- HUMV 2471: IS*Aba125*, de la familia IS30 de *A. baumannii*.
- HUMV 2790: IS*Aba1*, de la familia IS4 de *A. baumannii*.
- HUMV 3743: IS*Aba1*, de la familia IS4 de *A. baumannii*.
- HUMV 0315: IS*Aba125*, de la familia IS30 de *A. baumannii*.
- HUMV 6207: elevada homología con IS*1236*, de la familia IS3 de *A. calcoaceticus*.
- HUMV 5918: elevada homología con IS*Aba13*, de la familia IS5 de *A. baumannii*.
- HUMV 6483: IS*Aba125*, de la familia IS30 de *A. baumannii*.

iii. Mapeo de mutaciones

Como está previamente descrito, mutaciones en los genes de las proteínas diana de los antibióticos fluoroquinolonas, ADN girasa y topoisomerasa, parecen contribuir a la resistencia de estos antibióticos en estas bacterias. Por ello, se empleó el software MEGA para realizar alineamientos (ClustalW) de las secuencias de dichas proteínas e identificar las posibles mutaciones en sus genes.

La Figura 54 muestra la secuencia de aminoácidos de la subunidad A de la ADN girasa de las 5 cepas secuenciadas de *A. baumannii*. En ella se observa una sustitución en la posición 81 en las cepas resistentes a ciprofloxacino (Tabla 10) del aminoácido serina (S) por leucina (L).

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|----|---|----|---|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 50 | | 81 | | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ATCC 19606 | M | H | E | L | G | N | D | Y | N | K | A | Y | K | K | S | A | R | V | V | G | D | V | I | G | K | Y | H | P | H | G | D | S | A | V | Y | E | T | I | V | R | M | A | Q | D | F | S | L | R | Y | L | L |
| HUMV 1319 | M | H | E | L | G | N | D | Y | N | K | A | Y | K | K | S | A | R | V | V | G | D | V | I | G | K | Y | H | P | H | G | D | L | A | V | Y | E | T | I | V | R | M | A | Q | D | F | S | L | R | Y | L | L |
| HUMV 2471 | M | H | E | L | G | N | D | Y | N | K | A | Y | K | K | S | A | R | V | V | G | D | V | I | G | K | Y | H | P | H | G | D | L | A | V | Y | E | T | I | V | R | M | A | Q | D | F | S | L | R | Y | L | L |
| HUMV 2790 | M | H | E | L | G | N | D | Y | N | K | A | Y | K | K | S | A | R | V | V | G | D | V | I | G | K | Y | H | P | H | G | D | L | A | V | Y | E | T | I | V | R | M | A | Q | D | F | S | L | R | Y | L | L |
| HUMV 3743 | M | H | E | L | G | N | D | Y | N | K | A | Y | K | K | S | A | R | V | V | G | D | V | I | G | K | Y | H | P | H | G | D | L | A | V | Y | E | T | I | V | R | M | A | Q | D | F | S | L | R | Y | L | L |

Figura 54: Alineamiento y mapeo de mutaciones en secuencia de aminoácidos de ADN girasa en *A. baumannii*.

En la Figura 55 se muestra la misma secuencia de las cepas de *A. pittii*, mostrando la misma sustitución puntual en HUMV 0315, siendo en este caso la única cepa resistente al antibiótico ciprofloxacino (véase Tabla 12).

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|----|---|----|---|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 50 | | 81 | | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| HUMV 0315 | M | H | E | L | G | N | D | Y | N | K | A | Y | K | K | S | A | R | V | V | G | D | V | I | G | K | Y | H | P | H | G | D | L | A | V | Y | E | T | I | V | R | M | A | Q | D | F | S | L | R | Y | L | L |
| HUMV 4336 | M | H | E | L | G | N | D | Y | N | K | A | Y | K | K | S | A | R | V | V | G | D | V | I | G | K | Y | H | P | H | G | D | S | A | V | Y | E | T | I | V | R | M | A | Q | D | F | S | L | R | Y | L | L |
| HUMV 6207 | M | H | E | L | G | N | D | Y | N | K | A | Y | K | K | S | A | R | V | V | G | D | V | I | G | K | Y | H | P | H | G | D | S | A | V | Y | E | T | I | V | R | M | A | Q | D | F | S | L | R | Y | L | L |
| HUMV 5918 | M | H | E | L | G | N | D | Y | N | K | A | Y | K | K | S | A | R | V | V | G | D | V | I | G | K | Y | H | P | H | G | D | S | A | V | Y | E | T | I | V | R | M | A | Q | D | F | S | L | R | Y | L | L |
| HUMV 6483 | M | H | E | L | G | N | D | Y | N | K | A | Y | K | K | S | A | R | V | V | G | D | V | I | G | K | Y | H | P | H | G | D | S | A | V | Y | E | T | I | V | R | M | A | Q | D | F | S | L | R | Y | L | L |

Figura 55: Alineamiento y mapeo de mutaciones en secuencia de aminoácidos de ADN girasa en *A. pittii*.

Las Figuras 56 y 57 muestran el mismo proceso llevado a cabo en la secuencia de aminoácidos de la topoisomerasa IV codificada por el gen *parC*, en las cepas analizadas de *A. baumannii* y *A. pittii*, respectivamente. En este caso las mutaciones se localizan en las posiciones 84 y 88, con sustituciones de serina (S) por leucina (L), y de glutámico (E) por lisina (K), respectivamente.

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|----|---|----|---|----|---|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 50 | | 84 | | 88 | | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ATCC 19606 | V | Y | A | M | S | E | L | G | L | K | S | S | G | K | P | K | S | A | R | T | V | G | D | V | L | G | K | Y | H | P | H | G | D | S | A | C | Y | E | A | M | V | L | M | A | Q | P | F | S | Y | R |
| HUMV 1319 | V | Y | A | M | S | E | L | G | L | K | S | S | G | K | P | K | S | A | R | T | V | G | D | V | L | G | K | Y | H | P | H | G | D | L | A | C | Y | E | A | M | V | L | M | A | Q | P | F | S | Y | R |
| HUMV 2471 | V | Y | A | M | S | E | L | G | L | K | S | S | G | K | P | K | S | A | R | T | V | G | D | V | L | G | K | Y | H | P | H | G | D | S | A | C | Y | K | A | M | V | L | M | A | Q | P | F | S | Y | R |
| HUMV 2790 | V | Y | A | M | S | E | L | G | L | K | S | S | G | K | P | K | S | A | R | T | V | G | D | V | L | G | K | Y | H | P | H | G | D | L | A | C | Y | E | A | M | V | L | M | A | Q | P | F | S | Y | R |
| HUMV 3743 | V | Y | A | M | S | E | L | G | L | K | S | S | G | K | P | K | S | A | R | T | V | G | D | V | L | G | K | Y | H | P | H | G | D | L | A | C | Y | E | A | M | V | L | M | A | Q | P | F | S | Y | R |

Figura 56: Alineamiento y mapeo de mutaciones en secuencia de aminoácidos de topoisomerasa IV en *A. baumannii*.

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|----|---|----|---|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 50 | | 84 | | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| HUMV 0315 | V | Y | A | M | S | E | L | G | L | K | S | S | G | K | P | K | S | A | R | T | V | G | D | V | L | G | Y | H | P | H | G | D | L | A | C | Y | E | A | M | V | L | M | A | Q | P | F | S | Y | R |
| HUMV 4336 | V | Y | A | M | S | E | L | G | L | K | S | S | G | K | P | K | S | A | R | T | V | G | D | V | L | G | Y | H | P | H | G | D | S | A | C | Y | E | A | M | V | L | M | A | Q | P | F | S | Y | R |
| HUMV 6207 | V | Y | A | M | S | E | L | G | L | K | S | S | G | K | P | K | S | A | R | T | V | G | D | V | L | G | Y | H | P | H | G | D | S | A | C | Y | E | A | M | V | L | M | A | Q | P | F | S | Y | R |
| HUMV 5918 | V | Y | A | M | S | E | L | G | L | K | S | S | G | K | P | K | S | A | R | T | V | G | D | V | L | G | Y | H | P | H | G | D | S | A | C | Y | E | A | M | V | L | M | A | Q | P | F | S | Y | R |
| HUMV 6483 | V | Y | A | M | S | E | L | G | L | K | S | S | G | K | P | K | S | A | R | T | V | G | D | V | L | G | Y | H | P | H | G | D | S | A | C | Y | E | A | M | V | L | M | A | Q | P | F | S | Y | R |

Figura 57: Alineamiento y mapeo de mutaciones en secuencia de aminoácidos de topoisomerasa IV en *A. pittii*.

6. Estabilidad de plásmidos

Se evaluó la estabilidad de los plásmidos detectados mediante PCR hasta pasadas las 250 generaciones.

a. Tiempo de generación

Para poder comprobar la estabilidad de los plásmidos a lo largo del tiempo, se calcularon en primer lugar los tiempos de generación, como la constante de velocidad de crecimiento (μ) expresada en minutos. El resultado se muestra en la Tabla 22.

| CEPA | TIEMPO DE GENERACIÓN (min) |
|------------|----------------------------|
| ATCC 19606 | 37 |
| HUMV 1319 | 35 |
| HUMV 2471 | 29 |
| HUMV 2790 | 35 |
| HUMV 3743 | 30 |
| HUMV 0315 | 33 |

Tabla 22: Tiempo de generación de las cepas de *Acinetobacter*.

b. Estabilidad en generaciones

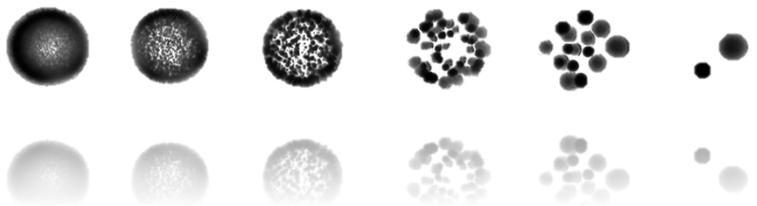
Los plásmidos se consideraron estables una vez seguían siendo detectados tras pasar 250 generaciones, del mismo modo que De Gelder y colaboradores en su trabajo (2007). Se realizaron un total de 6 pases cada 24 h (168 h totales). En todos los casos se detectaron los plásmidos tras ese tiempo de todas las colonias analizadas, por lo que esos 6 plásmidos fueron considerados estables.

El número de generaciones finales varió para cada una de las cepas, así como el tiempo de generación de cada una. De modo que las generaciones finales para cada una de las cepas fueron, aproximadamente, las siguientes:

- ATCC 19606: 272 generaciones.
- HUMV 1319: 288 generaciones.

- HUMV 2471: 347 generaciones.
- HUMV 2790: 288 generaciones.
- HUMV 3743: 336 generaciones.
- HUMV 0315: 305 generaciones.

DISCUSIÓN



1. Curvas de crecimiento

Desde el descubrimiento de los antibióticos a principios del siglo XX, su utilización en la prevención y tratamiento de infecciones bacterianas ha sido ampliamente extendida. La emergencia de resistencia a compuestos antimicrobianos entre los microorganismos es una respuesta biológica natural a una presión de selección. No obstante, el mal y extendido uso de dichos compuestos ha provocado un aumento significativo de las bacterias resistentes a varias clases de antibióticos y reducido la efectividad de otros, considerándose este fenómeno un riesgo para la salud pública mundial (Tacconelli *et al.*, 2017).

Desde hace unas décadas, el género *Acinetobacter* está adquiriendo mayor relevancia clínica debido a la capacidad de algunas especies patógenas, principalmente *A. baumannii* pero también de interés otras como *A. pittii*, para adquirir rápida y fácilmente resistencia a diversas clases de antimicrobianos. De hecho, debido a la reciente descripción de *A. pittii* como especie así como la implementación de técnicas moleculares en la identificación de especies a nivel clínico, es probable que se haya infravalorado el potencial patogénico de esta especie en favor de *A. baumannii*, aunque la literatura sobre la misma sigue siendo muy escasa (Nemec *et al.*, 2011; Pailhoriès *et al.*, 2016).

En la caracterización fenotípica de la velocidad de crecimiento realizada en esta tesis doctoral, se emplearon diversas cepas clínicas de ambas especies patógenas, *A. baumannii* (4 clínicas del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla y 1 cepa de referencia) y *A. pittii* (5 clínicas y 1 de referencia), para comparar la capacidad de crecimiento que poseen ambas especies en igualdad de condiciones. Los resultados mostraron que si bien existe una ligera variabilidad, no hay diferencias significativas al comparar las curvas de ambas especies. Esto apoya la hipótesis de que ambas especies son muy similares; de hecho, *A. pittii* se considera la especie más similar a *A. baumannii* dentro del complejo Acb (Peleg *et al.*, 2012; Pailhoriès *et al.*, 2016).

2. Determinación de concentraciones mínimas inhibitorias

Como consecuencia del gran número de aislados de *A. baumannii* y de *A. pittii* multirresistentes, incluyendo a antibióticos de último recurso como la colistina, la caracterización de los perfiles de resistencia de dichos patógenos sigue siendo de gran importancia a nivel clínico y epidemiológico (Tacconelli *et al.*, 2017). A nivel clínico, dicha importancia radica en la alta frecuencia de resistencias, la cual reduce la posibilidad de tratamiento, lo que resalta la importancia de aplicar esos datos a la práctica clínica (Andersson y Hughes, 2011). A nivel epidemiológico, se ha visto que dichas cepas pueden actuar de reservorios de estos genes para especies patógenas más virulentas, como enterobacterias, con las que comparten el ambiente hospitalario, lo que supone un peligro añadido (Dijkshoorn *et al.*, 2007; Bogaerts *et al.*, 2013).

Se ha evaluado la sensibilidad antibiótica de la colección cepas de *A. baumannii* y *A. pittii* a 7 antibióticos, representantes de las principales clases de los mismos. Se obtuvo como resultado que todas las cepas fueron altamente resistentes a ampicilina y eritromicina. El conjunto de cepas de *A. baumannii* además, presentaron resistencia a meropenem, característica que solo fue exhibida por una cepa de *A. pittii*. En cambio, mientras que solo 3 de los 5 aislados de *A. baumannii* mostraron resistencia a colistina, el 100% de las cepas de *A. pittii* resultaron resistentes, fenómeno previamente descrito por otros autores para estas especies (Turton *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2011). Como se evaluó la sensibilidad a un compuesto de cada clase, las cepas que mayor número de resistencias exhibieron, incluso a los 7 antibióticos evaluados (2 de las 5 cepas de *A. baumannii*) solo pueden categorizarse como multirresistentes.

En el caso de *A. baumannii*, los valores de las CMI₅₀ del conjunto analizado fueron muy superiores a los puntos de corte definidos, resaltando con ello el alto nivel de resistencia de las cepas de este patógeno. Si bien dichos valores, especialmente las CMI₉₀ de *A. pittii* son en su mayoría elevados, exhiben sensibilidad a más antimicrobianos que la otra especie.

Estos datos concuerdan con los de diversos estudios que muestran como *A. baumannii* presenta resistencia a la mayoría de compuestos antibióticos disponibles en la actualidad (Goic-Barisic *et al.*, 2016; Lean *et al.*, 2016b). Del mismo modo que a nivel global, *A. pittii* es más sensible que *A. baumannii* a un gran número de antimicrobianos, también se han encontrado cepas MDR en esta especie (Wisplinghoff *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2018).

3. Estudio de supervivencia

La supervivencia de microorganismos patógenos en el ambiente sanitario tiene un papel muy relevante en las infecciones nosocomiales. La contaminación del paciente puede deberse al contacto con manos o equipos de protección de profesionales sanitarios portadores de las bacterias, con dispositivos médicos ineficazmente limpiados, o por contacto directo con superficies inanimadas contaminadas (Dijkshoorn *et al.*, 2007; Otter *et al.*, 2013; Chemaly *et al.*, 2014).

a. Supervivencia en desecación y privación de nutrientes

Un factor importante que contribuye a la diseminación y persistencia de *Acinetobacter* en entornos hospitalarios es su capacidad para soportar la desecación durante largos periodos de tiempo y sobrevivir sobre superficies inanimadas (Lenie Dijkshoorn *et al.*, 2007; La Forgia *et al.*, 2010). La persistencia de estas cepas en el ambiente lleva a una exposición constante a agentes biocidas y antibióticos, que favorecen la selección de cepas resistentes, causando la diseminación y contaminación cruzada de cepas frente a las que tenemos menos opciones terapéuticas. Por ello, tanto la desinfección como el control de la transmisión son esenciales en el entorno hospitalario (Espinal *et al.*, 2012; Otter *et al.*, 2013; Doll *et al.*, 2018). Debido a esto, conocer la capacidad de persistencia de las cepas resulta fundamental para diseñar protocolos correctos de actuación y desinfección tanto de instalaciones como de dispositivos médicos.

Existen diversos trabajos que ponen de manifiesto la capacidad de *A. baumannii* para sobrevivir durante largos periodos de tiempo sobre superficies inertes en ambientes desfavorables como el hospitalario (Jawad *et al.*, 1996; Wendt *et al.*, 1997; Bravo *et al.*, 2016; Doll *et al.*, 2018). Por el contrario, no existen datos publicados sobre la resistencia de cepas clínicas de *A. pittii* a condiciones ambientales desfavorables ni de su persistencia en las instalaciones hospitalarias. En cambio, sí se conoce la capacidad recalcitrante de esta especie a condiciones adversas que dificultan su erradicación de las instalaciones sanitarias (Turton *et al.*, 2010).

En el trabajo de esta tesis doctoral se evaluó la resistencia de cepas de *A. baumannii* y *A. pittii* a desecación y a privación de nutrientes sobre diferentes superficies, que pueden encontrarse en el ambiente hospitalario, como son el plástico, el cristal o las batas de algodón del laboratorio. Para ello se cuantificó la cantidad de las bacterias, que eran capaces de sobrevivir a lo largo del tiempo tras ser sometidas a deshidratación o estar mantenidas en

ambiente acuoso pero sin disponibilidad de nutrientes. Posteriormente, las bacterias rehidratadas se pusieron en contacto con un ambiente favorable de disposición de nutrientes a 37°C, simulando el entorno que pueden encontrar las bacterias al infectar o colonizar a un nuevo hospedador. Dicho ensayo se realizó con cada cepa, en el periodo de tiempo definido, recuperada de las diferentes superficies empleadas para simular el ambiente hospitalario (plástico, cristal, bata de laboratorio y solución salina). No obstante, quiso comprobarse si las bacterias se veían afectadas por el proceso de aclimatación, ya que puede ser en sí un proceso estresante (Ramos *et al.*, 2001); se evaluó por ello su capacidad para crecer en una fuente de nutrientes a temperatura ambiente, la misma a la que habían sido mantenidas. También se evaluó el mínimo inóculo recuperable en las condiciones de laboratorio empleadas, ya que existe algo de variabilidad sobre la carga microbiana ambiental de estas especies en las superficies hospitalarias (Johani *et al.*, 2017; Doll *et al.*, 2018). En las condiciones ensayadas se obtuvo un valor de 10³ UFCs, inferior a la cantidad que puede encontrarse en el ambiente, en base al trabajo de esos autores.

En primer lugar, respecto al efecto de la temperatura en la aclimatación a un ambiente favorable, la temperatura no parece ser un determinante importante que favorezca o dificulte su aclimatación, para ninguna de las cepas ensayadas, al menos en las condiciones de nuestro experimento. No obstante, las temperaturas empleadas fueron ≈22°C y 37°C, un rango en el que *Acinetobacter* es capaz de crecer.

En lo que a capacidad de supervivencia en desecación se refiere, las cepas de *A. baumannii* resultaron ser capaces de sobrevivir tras 60 días sometidas a desecación, en las 3 superficies analizadas, de manera diferencial entre cepas, y con apenas disminución de la viabilidad para aquellas mantenidas en un ambiente acuoso. Estos datos están en consonancia con los obtenidos por Bravo y colaboradores, aunque el tiempo final del experimento en su caso fueron 30 días (Bravo *et al.*, 2016). La cepa que presentó la menor capacidad de supervivencia en todas las superficies fue la cepa ATCC 19606, aislada de una muestra de orina, y que se utiliza como referencia en multitud de trabajos científicos (Bergogne-Bérézin y Towner, 1996; Wendt *et al.*, 1997; Peleg *et al.*, 2009; Luke *et al.*, 2010; Gaddy *et al.*, 2012; Peleg *et al.*, 2012; Tomaras *et al.*, 2003; Bravo *et al.*, 2016; Chatterjee *et al.*, 2017).

Los resultados muestran que la supervivencia a largo plazo de *A. baumannii* en superficies inanimadas tras someterse a desecación solo se ve afectada por el material empleado, ya que se observó una constante reducción de la capacidad de cultivo en las

superficies de plástico, cristal y bata de laboratorio. Existen variaciones apenas detectables entre las superficies de plástico y cristal, observándose un mayor descenso en plástico, en general, pero sin una diferencia significativa. Esto está en contraste con los resultados obtenidos por Wendt y colaboradores, en los que obtuvieron que la desecación afectaba de manera diferencial a las cepas en función del origen del aislado y sin influencia del material usado (Wendt *et al.*, 1997). Esto puede ser en parte debido a las diferencias de metodología empleadas, así como a las cepas, pero es probable que sea causado por el sesgo que genera el muestreo ambiental, ya que selecciona las cepas más tolerantes a la desecación mientras que las cepas aquí incluidas han sido todas aisladas de pacientes (Wendt *et al.*, 1997; Greene *et al.*, 2016). No obstante, existe una marcada variabilidad de supervivencia entre cepas, pese a tener todas un origen clínico y pertenecer a la misma especie, del mismo modo que otros autores han señalado previamente (Wendt *et al.*, 1997; Jawad *et al.*, 1998; Espinal *et al.*, 2012; Gayoso *et al.*, 2014; Bravo *et al.*, 2016; Greene *et al.*, 2016). Pese a esto, según la definición de Farrow y colaboradores, las 5 cepas analizadas poseen una alta tolerancia a la desecación, al menos en las condiciones testadas, ya que su fenotipo se caracteriza por la supervivencia de una gran proporción de células tras un extenso periodo temporal (Farrow *et al.*, 2018). Si bien el material que supuso mayor reto para la supervivencia de las bacterias fue el tejido de algodón de la bata de laboratorio al compararlo con las otras condiciones, un porcentaje significativo del inóculo inicial se mantuvo viable en todas las cepas. Sin embargo, el proceso de recuperación de células del tejido frente a las superficies de plástico y cristal fue diferente, lo que podría tener también algún efecto sobre el resultado final. Estos datos son especialmente relevantes, puesto que no existen datos en la literatura sobre ensayos similares previos; y a la vista de que el personal sanitario es, a menudo, portador de estas bacterias en sus guantes y batas (Morgan *et al.*, 2010; Munoz-Price *et al.*, 2012; Morgan *et al.*, 2013). Por ello, se evaluaron la morfología y adherencia de las bacterias al tejido de algodón mediante microscopía SEM, comparando aquellas recién inoculadas con las que permanecieron en la bata durante 60 días. A pesar de que se observó algún cambio en la morfología de las bacterias mantenidas durante más tiempo en desecación, en ambos casos permanecieron firmemente adheridas a las fibras de algodón, incluso tras los lavados requeridos para la preparación de las muestras.

La variabilidad del fenotipo de tolerancia entre cepas fue incluso más significativa entre los aislados de la especie *A. pittii*, los cuales fueron sometidos a las mismas condiciones durante un periodo de tiempo menor. La cepa que, en conjunto, mostró menor tolerancia a la desecación fue la de referencia LMG 10559, aislada en este caso de una muestra de aspirado

traqueal. En conjunto, al igual que para el patógeno *A. baumannii*, la menor supervivencia se obtuvo en las muestras mantenidas en desecación en bata de laboratorio; y la menor reducción de viabilidad en aquellas que estuvieron en ambiente acuoso, con menos del 20% de reducción final. Pese a esto, 2 de las cepas mantuvieron más del 40% de la población inicial cultivable tras 6 semanas en desecación en bata de laboratorio, las cepas HUMV 5918 y HUMV 6483, aisladas de exudado de herida y de orina, respectivamente. En este conjunto, la variabilidad entre los valores finales de plástico y cristal fueron más acuciados que en el caso anterior, especialmente en la cepa HUMV 6207, también aislada de un exudado de herida, que mostró más tolerancia a la desecación en cristal que en ninguna de las otras superficies. Apenas existen datos previos sobre la tolerancia a la desecación de *A. pittii*, si bien se realizó un trabajo con 2 cepas (una clínica y otra de origen no especificado), con una supervivencia máxima de 10 días en desecación sobre cristal en esas condiciones (Jawad *et al.*, 1996). En ese estudio definieron las cepas como resistentes a la desecación cuando permanecían viables tras 11 días, pero no calcularon la cantidad exacta de bacterias viables.

Previamente, se ha demostrado que cepas de especies pertenecientes al complejo Acb muestran más persistencia ambiental que aquellas del género no incluidas en él. Y, entre ellas, *A. baumannii* parece ser la especie más resistente a la desecación (Jawad *et al.*, 1996; Houang *et al.*, 1998). Debido a la complejidad en la diferenciación de dichas especies, es probable que resultados anteriores a la identificación de especies por métodos moleculares puedan estar relacionados a otras especies del complejo y no solo a *A. baumannii*. Por lo que, partiendo de la idea de que las especies *A. baumannii* y *A. pittii* son genética y metabólicamente muy similares, y que ambas han sido detectadas como consecuencia de contaminación ambiental hospitalaria, los datos podrían ser comparables teniendo en cuenta la premisa de que son especies distintas.

b. Valoración estado VBNC

Pese a estar bien descrita la capacidad de bacterias de *Acinetobacter* spp., especialmente de *A. baumannii*, para tolerar la desecación, apenas se conoce el motivo por el que presentan dicha habilidad. Por ello, se quiso comprobar la posibilidad de que las cepas utilizadas en este trabajo pudieran poseer estado VBNC, ya que está bien establecido que diversos tipos de estrés pueden inducirlo, como la privación de nutrientes (Oliver, 2010). El estado VBNC o quiescencia celular es una estrategia de supervivencia llevada a cabo por numerosas bacterias, en la que los microorganismos no son capaces de crecer en medios de cultivo convencionales pero retienen algunas funciones metabólicas detectables.

Para poder evaluarlo se realizaron diferentes ensayos, cuantitativos y cualitativos. Los ensayos cuantitativos consistieron en emplear un medio de recuperación para el cultivo de las bacterias en lugar de un medio normal (LA), para lo que se empleó el suplemento de piruvato sódico, que está bien establecido en la literatura como un factor que permite el recrecimiento de las bacterias que han entrado en ese estado (Martin *et al.*, 1976; Calabrese y Bissonnette, 1990; Olson *et al.*, 2000; Ducret *et al.*, 2014). No se observaron diferencias al emplear diferentes concentraciones de piruvato en el medio (entre 0,5 y 1%). Los ensayos cualitativos por su parte consistieron en realizar tinciones sobre las bacterias desecadas sobre la superficie de cristal con el kit comercial *BacLight LIVE/DEAD* que tiñen de manera diferencial las células que permanecen con la membrana intacta (vivas) de aquellas que tienen la membrana comprometida (muertas), de verde y rojo respectivamente. Esta técnica ha sido previamente utilizada y ampliamente descrita para la evaluación del estado VBNC, como un apoyo visual de los métodos cuantitativos más precisos (Oliver, 2010; Nocker *et al.*, 2012; Bravo *et al.*, 2016).

Al analizar los resultados obtenidos de las bacterias cultivadas en medio de recuperación en ambas especies, se observó la misma tendencia en todos los casos, para todas las cepas y condiciones, que se observaba con el medio de cultivo normal. Del mismo modo, no se observaron diferencias al utilizar medio de recuperación e incubar las bacterias con nutrientes a temperatura ambiente, es decir, presentaban el mismo comportamiento en medio normal y medio de resucitación. En cuanto a los valores finales de bacterias cultivables no presentaron diferencias significativas entre ambas condiciones, ni a nivel de cepas individuales ni como especies en conjunto. Por ello, se consideró que el estado VBNC no se indujo en dichas cepas de *Acinetobacter* spp. en las condiciones empleadas, porque la adición de piruvato de sodio al medio no afectó a la capacidad de resucitación. Estos datos concuerdan con lo publicado previamente para *A. baumannii* (Bravo *et al.*, 2016).

Adicionalmente, se comprobó mediante tinción diferencial de bacterias vivas y muertas y su visualización por microscopía confocal. En dichas imágenes se observó la progresión de una población mayoritariamente verde (viva) a una predominantemente roja o anaranjada (muerta) que concuerda con los datos obtenidos a nivel cuantitativo. Es importante señalar que pese a que esta técnica permite analizar los resultados de un modo más visual, solo es un apoyo al ensayo de recuento bacterias viables porque en la microscopía los campos de visión son limitados y seleccionados al azar, y no todos son igual de representativos ni tienen la misma cantidad de células en ellos. Por ello, al cuantificar el

número de píxeles en cada color correspondientes a las células bacterianas vivas o muertas, no se observa la misma disminución en todas pese a que sí se observa en las imágenes, ya que es una medida dependiente de la biomasa. Algo llamativo en la cuantificación es que incluso a tiempo inicial, en el que se observa claramente un predominio de bacterias verdes hay un porcentaje de biomasa correspondiente a bacterias muertas, porque el proceso de deshidratación mata a muchas de ellas. De modo que, si bien esta tinción proporciona un apoyo más sólido a la conclusión de que estas cepas de *Acinetobacter* spp. no poseen estado VBNC, no se puede olvidar que debido a sus limitaciones no puede ser empleada por sí sola para ofrecer datos cuantitativos.

c. Adherencia a superficies abióticas

Entre los mecanismos propuestos como responsables de la habilidad de patógenos nosocomiales para persistir en ambientes desfavorables, como privación de nutrientes y condiciones de desecación, sin poseer estructuras de supervivencia específicas, se encuentra la capacidad de formar biofilms (Gaddy y Actis, 2009; Espinal *et al.*, 2012; Badave y Dhananjay, 2015; Flemming *et al.*, 2016).

La capacidad de *A. baumannii* para formar biofilms sobre superficies inanimadas está bien documentada, llegando a ser considerada un factor de virulencia del patógeno (Vidal *et al.*, 1996; Longo *et al.*, 2014; Vijayakumar *et al.*, 2016). Por ello, se quiso valorar la capacidad de las cepas incluidas en este trabajo a lo largo del periodo de desecación y/o privación de nutrientes. Se añadió medio fresco directamente sobre las bacterias mantenidas en desecación, ya que la rehidratación permite a las células recuperar la fluidez de membrana; y se inoculó en paralelo con las bacterias mantenidas en ambiente acuoso. Durante el periodo de incubación se tomaron muestras del medio para evaluar la capacidad de adaptación al cambio de ambiente, con humedad y disponibilidad de nutrientes. Lo que se obtuvo fue que las bacterias se adaptaron rápidamente al ambiente favorable, condiciones propias de un nuevo hospedador, pese a mantenerse distintos intervalos temporales en condiciones de desecación. Cabe destacar que el número inicial de bacterias (primeras 12 h de incubación) se vio disminuido en los periodos más largos, lo que podría indicar que necesitan más tiempo para recuperarse a mayores periodos de desecación y/o que están más adheridas a la superficie y tardan más en producir células planctónicas.

En lo que a formación de biofilm (anillo en la interfase) se refiere, las cepas que se emplearon presentaron un fenotipo variable, que concuerda con los resultados de otros

trabajos (Rodríguez-Baño *et al.*, 2008; Vijayakumar *et al.*, 2016). Los distintos aislados se comportaron de diferente manera en función del origen de las bacterias, esto es en base a la superficie sobre la que se desecación o el ambiente en que se mantuvieron inicialmente. Sobre plástico y cristal, las cepas mantuvieron o incrementaron en algunos casos la cantidad de biofilm formado conforme aumentó el tiempo de desecación. En el caso de las cepas mantenidas en bata hubo un comportamiento más variable, ya que se observaron cepas que lo aumentaron, otras que lo mantuvieron y otras que lo disminuyeron. Las cepas ATCC 19606 y HUMV 3743 (aisladas de orina y exudado de orina, respectivamente) presentan mayor disminución del biofilm formado con el tiempo en desecación en bata, aunque la formación del mismo se vio muy aumentada en ellas a tiempos iniciales, en comparación con las otras superficies. En el caso de las que se mantuvieron en salino, hubo una tendencia más general a incrementar su cantidad significativamente. Solo una de las cepas presentó la misma tendencia en todas las condiciones (HUMV 2471, aislada de esputo), duplicando al menos la cantidad de biofilm que forma al comparar las bacterias recién desecadas (y aquellas que se encontraban en ambiente acuoso) con las mantenidas en esas condiciones durante 60 días. Esto contrasta con la premisa de Rodríguez-Baño y colaboradores que suponen que dado que el fenotipo de formación de biofilm es cepa-dependiente su expresión no varía bajo diferentes condiciones (Rodríguez-Baño *et al.*, 2008). En general, en el conjunto de cepas y condiciones, las bacterias tienen una tendencia mayor a mantener o incrementar la formación de biofilm a lo largo de periodos de estrés. Esto contrasta con los datos obtenidos por otros autores, aunque las diferencias podrían ser debidas a un diseño experimental diferente (Bravo *et al.*, 2016).

Aunque se conoce mucho menos la capacidad de adherencia de *A. pittii* a superficies inertes, sí se han identificado las mismas proteínas responsables de la adherencia en *A. baumannii* en esta especie (De Gregorio *et al.*, 2015). Se han evaluado las mismas características en las cepas de *A. pittii* que se analizaron en la especie *A. baumannii*. En primer lugar, la capacidad y velocidad de adaptación a un medio y temperatura favorables. Se obtuvo un resultado similar, una rápida aclimatación y un crecimiento final igual en todas las condiciones a lo largo del periodo de desecación, observándose de nuevo una disminución en el número inicial de bacterias que no supuso cambio para la densidad celular final. En cuanto a su capacidad de formación de biofilm, en ningún caso se observó disminución en la cantidad formada tras 6 semanas en condiciones de estrés. Comparando las superficies de plástico y cristal, las mismas cepas que aumentaron el biofilm en una superficie tendieron a hacerlo en la otra; por lo que las bacterias adheridas a dichas superficies se comportan de

manera similar en ellas. Las cepas mantenidas en bata presentan una mayor tendencia a mantener de manera estable la cantidad de biofilm formada, en su mayoría inferior que en las otras 2 superficies, con excepción de la cepa HUMV 6207 (aislada de un exudado de herida) que presentó una cantidad mucho mayor que en las otras condiciones. Cabe destacar que en el caso de *A. baumannii*, en esta condición hubo 2 cepas que disminuyen significativamente la formación de biofilm (incluso tras 40 días, tiempo similar al periodo máximo de desecación en *A. pittii*). Aquellas bacterias que se mantuvieron en solución salina presentaron en su mayoría un incremento significativo del biofilm formado tras haber estado 43 días con privación de nutrientes.

En ningún caso se observó relación entre el origen del aislado clínico y su capacidad de formar, mantener o incrementar la estructura de biofilm. Algunos autores han establecido una relación entre la formación de biofilm y los fenotipos multirresistentes, aunque no existe consenso entre si la relación entre ellos es directa o inversamente proporcional (Gaddy y Actis, 2009; Badave y Dhananjay, 2015; Greene *et al.*, 2016; Bardbari *et al.*, 2017). En este caso, para ninguna de las 2 especies se estableció ninguna relación entre el perfil de resistencia y la capacidad de formación de biofilm; de hecho, cepas con el mismo perfil de resistencia muestran una cantidad de biofilm muy distinta en cada condición. Esto puede ser debido a que el tamaño muestral aquí empleado para poder establecer una correlación es reducido y/o que estas cepas son muy variables, como sucede con muchos otros aspectos en estas bacterias.

d. Modelo animal de virulencia

Para evaluar la virulencia de las células estresadas de *A. baumannii* se empleó el modelo animal *Galleria mellonella*, cuyo uso ha sido previamente descrito para este patógeno (Peleg *et al.*, 2009; Wand *et al.*, 2012). El uso de modelos animales no mamíferos presenta muchas ventajas económicas y éticas. Además, en este caso, está bien establecida la correlación entre la virulencia de diversos patógenos en estos insectos y en modelos animales de mamíferos (Kavanagh y Reeves, 2004). De hecho, se está proponiendo como un método alternativo para evaluar la eficacia de antibióticos para reducir así el número de ellos que se prueban en mamíferos (Tsai *et al.*, 2016).

Para llevar a cabo el experimento se escogieron 2 cepas clínicas de *A. baumannii*, aquellas que presentaron mayor variabilidad en la supervivencia en bata en ambos medios y que fueron a su vez las más resistentes en todas las demás superficies. Las cepas elegidas

fueron HUMV 1319 y HUMV 2790 (aisladas de exudado de herida y úlcera cutánea, respectivamente), presentando la primera alta tolerancia a desecación en bata y la segunda siendo más sensible a ella. En primer lugar se determinó la dosis letal mínima, empleando para ello inóculos frescos, que fue establecida en 10^5 UFCs/larva, similar a lo obtenido por otros autores (Peleg *et al.*, 2009; Wand *et al.*, 2012). Para comparar la virulencia de las bacterias estresadas frente al de sus inóculos frescos, se emplearon aquellas mantenidas en solución salina durante 60 días. Pese al objetivo inicial de evaluar la virulencia de las bacterias mantenidas en desecación en bata (de ahí la elección de las cepas), no se obtuvo la dosis mínima letal para poder realizar el ensayo. En el recuento final de larvas vivas con la infección de la misma carga bacteriana de inóculos frescos y de células estresadas no se observaron diferencias. Esto parece indicar que estas bacterias no perdieron su virulencia tras 60 días bajo estrés, al menos en las condiciones y para las cepas testadas. De hecho, el número de larvas muertas fue ligeramente superior para aquellas inoculadas con bacterias estresadas, especialmente para la cepa HUMV 2790. No obstante, se requieren más ensayos y condiciones para poder obtener una conclusión más firme.

e. Resistencia a suero humano

Otra característica importante de la virulencia de los patógenos es la capacidad de evadir la actividad bactericida del suero humano, evitando así la defensa inmunitaria innata y acción del complemento, para poder establecer la infección. En el caso de *A. baumannii*, varios estudios muestran que un gran número de las cepas de dicho patógeno son resistentes a la acción del suero humano normal (Subashchandrabose *et al.*, 2016; Runci *et al.*, 2017; Sanchez-Larrayoz *et al.*, 2017). En el contexto de este trabajo se quiso analizar si las condiciones de desecación y privación de nutrientes a largo plazo modifican la resistencia de *A. baumannii* al suero humano.

Para ello se emplearon las mismas cepas que en los ensayos con modelo animal, utilizándose en este caso bacterias procedentes de inóculos frescos y sometidas a estrés durante 60 días en solución salina y en desecación sobre bata de laboratorio. Una vez comprobada su resistencia al suero humano normal o inmune, se evaluó su comportamiento al exponerse a distintas concentraciones de suero normal e inactivado por calor, de manera similar a cómo lo realizaron otros autores (King *et al.*, 2009).

En los inóculos frescos no hubo diferencia alguna en su comportamiento entre los 2 tipos de suero y las distintas concentraciones. En cuanto a los resultados obtenidos de las

células estresadas fueron variados. La cepa HUMV 1319 vio reducida ligeramente su resistencia al suero humano normal a ambas concentraciones cuando procedía de ambiente húmedo pero no cuando lo hacía de desecación. En cambio, la cepa HUMV 2790 no mostró ningún cambio en el comportamiento de las bacterias mantenidas en solución salina pero sí cuando procedía de las muestras de bata, disminuyendo su resistencia al suero a la concentración más alta hasta en un 50%. Cabe destacar que esta cepa fue la que presentó una mayor sensibilidad a la desecación en bata en los ensayos de supervivencia. En ambas cepas se vio un incremento del número de bacterias en los 30 primeros minutos de exposición al suero normal de mayor concentración, al tomar como inóculo bacterias de desecación. Por lo tanto, estas bacterias parecen capaces de mantener la resistencia al suero tras largos periodos de estrés, aunque en alguna condición particular esta se vea disminuida.

King y colaboradores, establecieron una relación directa entre las cepas formadoras de robustos biofilms y la resistencia al suero humano (King *et al.*, 2009). No obstante, los resultados obtenidos con las cepas de este estudio no concuerdan con esos datos, dado que ambas cepas son resistentes al suero pero forman un biofilm débil.

Pese a que están descritos distintos mecanismos de resistencia al suero humano, el empleado por *A. baumannii* permanece sin ser caracterizado, aunque parece que tanto el LPS como la cápsula ayudan a evadir su actividad bactericida (King *et al.*, 2009; Bhargava *et al.*, 2010; Tipton *et al.*, 2018). Resultados recientes parecen indicar que la alteración en genes asociados con la adquisición de hierro y la biogénesis del peptidoglicano podrían estar involucrados también en la resistencia al suero (Subashchandrabose *et al.*, 2016).

4. Análisis genómico

La mayor accesibilidad de plataformas de WGS ha llevado a un creciente número de genomas bacterianos secuenciados que permite la realización de análisis comparativos más exhaustivos. Esto proporciona potentes herramientas que son fuente de información constante y actualizada para incrementar el conocimiento sobre patógenos bacterianos. La secuenciación genómica permite, entre otros, identificar posibles factores de virulencia de cepas clínicas así como posibles dianas para el diagnóstico, tratamiento o desarrollo de vacunas; detectar pacientes colonizados en brotes hospitalarios; o distinguir las posibles rutas de transmisión de poblaciones bacterianas (Sahl *et al.*, 2013; Mancilla-Rojano *et al.*, 2019). Del mismo modo, los análisis de genómica comparativa permiten identificar regiones que contribuyen a la adquisición y/o diseminación de resistencias antibióticas o al establecimiento de la colonización o invasión en hospedador, y estimar el grado de variabilidad entre genomas (Lin y Lan, 2014; Mancilla-Rojano *et al.*, 2019).

No obstante, pese a la gran fuente de información que suponen las nuevas herramientas WGS, los datos epidemiológicos siguen siendo útiles y necesarios en la práctica clínica diaria; ya que el conjunto de datos de la metodología tradicional y la secuenciación de nueva generación proporcionan un análisis más detallado (Sahl *et al.*, 2011; Mancilla-Rojano *et al.*, 2019). Los métodos como MLST y PFGE pueden identificar diferencias entre aislados relacionados (brote hospitalario), pero WGS permite obtener la visión evolutiva y la relación de aislados distantes geográfica y temporalmente (Sahl *et al.*, 2011).

a. Comparativa de genomas

Desde hace aproximadamente una década, varios autores han comenzado a realizar análisis comparativos de los genomas de *A. baumannii*, con el fin de determinar el número de genes que componen tanto su pan-genoma como el genoma core, que permite obtener una visión de la relación y variabilidad entre las cepas (Adams *et al.*, 2008; Adams *et al.*, 2010; Di Nocera *et al.*, 2011; Sahl *et al.*, 2011; Peleg *et al.*, 2012; Touchon *et al.*, 2014; Wright *et al.*, 2014; Chan *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015). No obstante, pese a que en algunos casos se incluyen otras especies del género *Acinetobacter* en la comparativas para observar la variabilidad entre sus especies, no se han encontrado datos sobre estudios específicos realizados con genomas de *A. pittii* (Adams *et al.*, 2008; Peleg *et al.*, 2012; Touchon *et al.*, 2014).

En este trabajo, se empleó el software PanOCT para calcular el tamaño de genes que componen el pan-genoma y genoma core de las cepas secuenciadas de *A. baumannii* y *A. pittii*

mediante tecnología Illumina, así como el mismo para el conjunto de las cepas de ambas especies (Fouts *et al.*, 2012). Al analizar todas las cepas de manera conjunta se obtuvo un pan-genoma de 6917 genes, de los cuales 2711 fueron compartidos por todos los aislados ($\approx 39\%$), mientras que los genes accesorios únicos oscilaron en un rango de 90 (HUMV 2790) a 323 genes (HUMV 0315). Al comparar cada especie por separado, se obtuvieron tamaños de pan-genoma de 5244 y 5046 genes para *A. baumannii* y *A. pittii*, respectivamente. En el caso de *A. baumannii*, el genoma core se compuso de 2911 genes y los genes accesorios oscilaron entre 102 (HUMV 2790) y 368 (HUMV 1319), siendo la cepa con menor tamaño de genoma accesorio único la misma que para el conjunto de ambas especies. En el caso de *A. pittii*, el genoma core lo compusieron 3034 genes, y las cepas mostraron un abanico de genes accesorios únicos entre 281 (HUMV 6207) y 420 (HUMV 4336). El similar tamaño de los genomas core al comparar las especies de manera individual y entre sí resaltan que todas las cepas secuenciadas son genéticamente muy homogéneas.

El hecho de que el genoma core disminuye con el aumento de genomas incluidos en la comparación, al contrario que el tamaño del pan-genoma concuerda con los datos obtenidos por otros autores (Wright *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015). No obstante, dichos tamaños son muy variables en función del conjunto y del origen de las cepas de estudio. Los tamaños más extremos muestran un genoma core de 1590 y 1897 y un pan-genoma de 10849 y 11594, en un conjunto de 34 y 249 aislados, respectivamente (Touchon *et al.*, 2014; Chan *et al.*, 2015). El hecho de que el tamaño muestral varíe tanto en ambos casos pone de manifiesto la importancia del origen de los aislados, pudiendo considerarse subestimada la variabilidad genómica al incluir cepas muy relacionadas (mismo brote hospitalario). En el resto de trabajos el genoma core oscila entre 2000 y 3000 incluso con una variedad de tamaños muestrales de 3 a 69 genomas (Di Nocera *et al.*, 2011; Sahl *et al.*, 2011; Wright *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015).

Gracias a los datos obtenidos del análisis mediante PanOCT se realizó la representación de perfiles de pan-genoma con el software PanGP, que relaciona el número de genomas con la tendencia de aumento o disminución del número de genes que componen el genoma core y el pan-genoma (Zhao *et al.*, 2014). Del mismo modo que en el caso anterior se compararon los resultados obtenidos para el conjunto del género y de las especies individuales. Esta representación revela que la pendiente del número de genes del genoma core se aproxima a la asíntota mientras que el pan-genoma continúa su aumento casi linealmente incluso en el conjunto de 9 cepas de *Acinetobacter* spp. Estos resultados están en

consonancia con los obtenidos por otros autores al emplear el mismo software con tamaños muestrales mayores ($n=35$) (H. Li et al., 2015)

En esta tesis doctoral también se realizaron análisis comparativos enfocados a determinar la relación taxonómica entre las cepas. Gracias al software MEGA se establecieron árboles filogenéticos empleando las secuencias del gen codificante para ARNr 16S. Se incluyeron 2 genomas de cepas accesibles en GenBank ampliamente estudiados como referencias de cada especie, AYE para *A. baumannii* y PHEA-2 para *A. pittii*. Al establecer la filogenia del conjunto de aislados se observa perfectamente la separación entre las cepas pertenecientes a ambas especies; lo que también se comprobó mediante el cálculo de los valores ANI y DDH de todas las cepas (Coenye et al., 2005; Goris et al., 2007).

Dentro de las cepas de *A. baumannii*, HUMV 2790 y HUMV 3743 muestran más cercanía entre ellas que con el resto de aislados de la especie, obteniendo también valores más elevados tanto para los índices ANI (100%) como para DDH (96,8%). Al analizar la composición del genoma de ambas cepas, se identificó el mismo plásmido, lo que podría explicar esa mayor cercanía y homología entre ellas. También entre las cepas *A. pittii* se observaron 2 más cercanas entre ellas, HUMV 4336 y HUMV 5918, con valores ANI y DDH de 100% y 99,9% respectivamente, compartiendo en este caso la ausencia de plásmido en sus genomas. Las distancias ANI vienen determinadas por valores menos restrictivos que aquellas calculadas mediante DDH, por ello son más elevadas pudiendo llevar al error de considerar a las cepas iguales.

Por último, se empleó el software BRIG como herramienta de visualización del análisis comparativo (Alikhan et al., 2011). Dicho programa tiene ciertas limitaciones, ya que para obtener unos mejores resultados se requiere de un genoma cerrado para utilizar como referencia. Además, este programa realiza una comparación de los genomas con el de referencia y no por pares. No obstante, dado que el grupo de genomas empleado mostró una alta homología genética, es una herramienta útil para representar el nivel de similitud entre todas las cepas. En cualquier caso, se trata de un apoyo visual para los datos cuantitativos obtenidos mediante los métodos anteriores.

b. Anotación de genomas y subsistemas

En este trabajo se empleó la herramienta RAST para clasificar los genes identificados de los genomas secuenciados y anotados en subsistemas en base a su función (Aziz *et al.*, 2008). Se comparó la agrupación obtenida dentro del conjunto de cepas de cada especie de manera individual y de manera grupal en el género *Acinetobacter* spp.

En todos los casos, el mayor número de genes con función identificada se incluyeron en funciones asociadas al “Metabolismo” (proteínas, ARN, ADN, compuestos aromáticos, fósforo, azufre, nitrógeno), siendo este grupo algo mayor en *A. pittii*, pero sin diferencias significativas (T-test, $p=0,53$). Las siguientes funciones con mayor número de genes son aquellas relacionadas con componentes celulares, entre los que se incluyen aminoácidos, carbohidratos, cofactores y ácidos grasos. En el otro extremo, la función con menor número de genes es el descrito como “Dormancia y esporulación”, con solo 2 genes en él. Un grupo variable dentro de los conjuntos de ambas especies es el asociado con “Elementos transponibles”, que abarca genes entre 5 y casi 50 en las diferentes cepas, con mayor número de manera general en las cepas de *A. baumannii*. Los genes agrupados en las funciones de “División y ciclo celular” son muy constantes entre todas las cepas (35-37), resaltando la conservación de estos en la especie. Un grupo relevante tanto por su importancia patogénica como por su representación en el genoma es el asociado a funciones de “Virulencia y defensa”, donde se incluyen genes de resistencia a antibióticos, que cuenta con un abanico de genes entre 75 y 100. Más de 100 genes predichos se incluyen en todos los casos como responsables de síntesis de la pared celular y la cápsula bacterianas. Los grupos de genes asociados a funciones de “Respiración” (90-100 genes), “Transporte de membrana” (105-120 genes) y de “Respuesta a estrés” (110-125 genes) son muy constantes en todas las cepas de ambas especies.

Trabajos realizados por otros autores, principalmente enfocados a observar las diferencias entre cepas MDR y sensibles, o entre especies patógenas (*A. baumannii*) con representantes ambientales del género (*A. baylyi*) mostraron las mayores diferencias genómicas en el número de elementos asignados a funciones metabólicas (incluyendo procesos celulares y actividad catalítica) y la homología entre ellos (Adams *et al.*, 2008; Vallenet *et al.*, 2008). Se hipotetizó por ello que en especies patógenas, de manera más marcada en aquellas más sensibles a los antibióticos, se reducen los genes asignados al metabolismo que se ve más representado en aquellas que tienen un nicho ambiental. En otro trabajo en el que se compararon diferentes especies del género *Acinetobacter* más enfocado al

éxito como patógenos nosocomiales, empleando en este caso especies del complejo Acb, también se identificó una gran homología entre los genomas de *A. baumannii* y *A. pittii*, más que entre otras especies consideradas clínicamente menos exitosas como *A. nosocomialis* (Peleg *et al.*, 2012).

c. Determinantes de resistencia

El género *Acinetobacter*, especialmente *A. baumannii* ha suscitado mucho interés por la rápida y aparente facilidad que sus cepas exhiben para adquirir nuevos mecanismos de resistencia. Este fenómeno también se ha visto, aunque está menos estudiado, en otra especie patógena del género, *A. pittii*.

En este trabajo, se emplearon diferentes herramientas y programas bioinformáticos para anotar los genomas secuenciados (Prokka, RAST) e identificar en ellos determinantes de resistencia (CARD, abricate), secuencias de inserción (ISfinder) y mutaciones puntuales en genes asociados con la resistencia antimicrobiana (MEGA) (Siguier *et al.*, 2006; Aziz *et al.*, 2008; McArthur *et al.*, 2013; Seemann, 2014; Kumar *et al.*, 2016).

i. Identificación de genes

En el conjunto de las 5 cepas de *A. baumannii* se identificaron un conjunto de 8 genes distintos codificantes para enzimas modificadoras de aminoglucósidos: 2 genes codificantes de acetiltransferasas (*aac(3)-IIa* y *aac(6')-Ib*), 2 de nucleotidiltransferasas (*ant(2'')-Ia* y *ant(3'')-IIa*) y 4 de fosfotransferasas (*aph(3')-VI*, *aph(3')-VIIa*, *aph(3'')-Ib* y *aph(6)-Id*); familias previamente descritas para dicha bacteria (Gordon y Wareham, 2010; Roca *et al.*, 2012; Lean *et al.*, 2016; Costello *et al.*, 2019). Solo una de las cepas de *A. pittii* (HUMV 6483) mostró la presencia de un gen codificante de EMA (*ant(3'')-IIa*), que resultó ser el único presente en todas las cepas de *A. baumannii* (único gen en la cepa de referencia ATCC 19606) y por ello el más prevalente, lo que concuerda con datos de otro trabajo reciente (Costello *et al.*, 2019). Las cepas con un mayor repertorio de genes fueron HUMV 1319 y HUMV 3743. Todas las cepas de *A. baumannii*, a excepción de la de referencia ATCC 19606 mostraron resistencia a los aminoglucósidos. La cepa de *A. pittii* HUMV 6483 también mostró sensibilidad a gentamicina, por lo que la presencia de ese gen *per sé* no parece asociarse con la resistencia a dicho compuesto.

Todas las cepas analizadas, tanto de *A. baumannii* como *A. pittii* mostraron la presencia de un gen codificante de cefalosporinasas (*ampC*) aunque con amplia variedad de

alotipos entre ellas. La isoforma más prevalente fue ADC-25, codificada por 2 cepas de *A. baumannii* (HUMV 2790 y HUMV 3743) y por 2 de *A. pittii* (HUMV 4336 y HUMV 5918), identificada previamente en diversos trabajos (Boo *et al.*, 2009; Lv *et al.*, 2019). Un total de 7 variantes se encontraron entre las 10 cepas secuenciadas. Todas las cepas fueron resistentes a altas concentraciones de ampicilina.

En lo que a genes codificantes de oxacilinasas se refiere, todas las cepas presentaron varias isoformas, pero distintas entre ambas especies. Entre las cepas de *A. baumannii* la forma más predominante fue la codificada por el gen endógeno *bla_{OXA-51}*, portando todas ellas al menos dos isoformas. En total, 6 isoformas de la enzima OXA-51 diferentes fueron identificadas entre las 5 cepas: OXA-66, OXA-71, OXA-98, OXA-109, OXA-385 y OXA-386 (Evans y Amyes, 2014; Wilharm *et al.*, 2017). Dos cepas (HUMV 1319 y HUMV 2471) mostraron además la presencia de un gen adicional, *bla_{OXA-24}*, típicamente localizado en plásmidos, como el pMMC3 presente en la cepa HUMV 2471 (Rumbo *et al.*, 2011). Pese a que en otros trabajos se ha descrito el gen *bla_{OXA-23}* como el más prevalente codificante de carbapenemasa entre aislados de *A. baumannii*, en ninguna de las cepas incluidas en este trabajo fue detectado (Doi *et al.*, 2015; Shamsizadeh *et al.*, 2017).

Entre las cepas de *A. pittii*, todas presentaron el gen *bla_{OXA-325}* que codifica para una isoforma OXA-213, descrita por primera vez en *A. calcoaceticus* (Kamolvit *et al.*, 2014). Cuatro de las cepas (a excepción de HUMV 0315) mostraron otra isoforma adicional de la misma enzima, OXA-421, descrita recientemente para esta especie (Kamolvit *et al.*, 2015). En la cepa HUMV 0315 se identificaron 2 genes codificantes para 2 isoformas OXA-58, *bla_{OXA-58}* y *bla_{OXA-97}* (Evans y Amyes, 2014), que están consideradas como carbapenemasas de baja actividad. Dicha cepa fue la única que mostró resistencia al antibiótico meropenem.

Al identificar la presencia de bombas de expulsión se observó que todas las cepas poseían los operones de las bombas RND de expulsión múltiple *adeFGH* y *adeIJK*, capaces de expulsar tetraciclinas y fluoroquinolonas. En el caso de *AdeIJK* también está descrita su capacidad para alojar antibióticos β -lactámicos y macrólidos (Gordon y Wareham, 2010; Coyne *et al.*, 2011). En casi todos los casos también se identificaron los reguladores *AdeL* (no en la cepa HUMV 6207) y *AdeN*, responsables de la sobreexpresión de *adeFGH* y *adeIJK*, respectivamente (Coyne *et al.*, 2011). En cuanto al operón *adeABC* solo se identificaron las 3 subunidades en las cepas de *A. baumannii* HUMV 1319, HUMV 2790 y HUMV 3743; mientras que las restantes de esa especie así como la mayoría de *A. pittii* (a excepción de HUMV 6207 que no posee ninguna) mostraron solo los genes para las subunidades *AdeA* y

AdeB. En cuanto al operón regulador *adeRS* de este sistema, no se detectó en ninguna cepa de *A. pittii*, y sí en todas las cepas de *A. baumannii*, con la peculiaridad de que en la cepa HUMV 2471 solo se encontró el gen de la subunidad AdeR, siendo una de las cepas que carecía de la subunidad AdeC. Sin embargo, se sabe que estas subunidades son *a priori* suficientes para llevar a cabo su función, siempre y cuando se acoplen a otro canal de membrana externa. La bomba AdeABC (o AdeAB) es capaz de expulsar la mayoría de compuestos antimicrobianos, encontrándose sobreexpresada cuando el regulador AdeRS se encuentra mutado (Gordon y Wareham, 2010; Coyne *et al.*, 2011; Du *et al.*, 2018). Todas las cepas (*A. baumannii* y *A. pittii*) analizadas mostraron la presencia del gen *abeS* que codifica una bomba SMR cuyo sustrato son macrólidos (descrito para *A. baumannii*); y *abeM* para una bomba de la familia MATE cuya función mayoritaria se enfoca en la expulsión de fluoroquinolonas (descrito para *A. baumannii*) (Gordon y Wareham, 2010; Du *et al.*, 2018).

ii. Identificación de secuencias de inserción

La presencia de secuencias de inserción se ha asociado comúnmente con la existencia de genes de resistencia, recayendo su importancia (al igual que la de los transposones) en su capacidad para moverse y/o duplicarse a sí mismos, portando con ellos los genes que flanquean (Li *et al.*, 2015; Wong *et al.*, 2017; Partridge *et al.*, 2018). Por ello, se empleó el software ISfinder, que posee una extensa base de datos sobre las secuencias de inserción descritas, para identificar la presencia de las mismas en los genomas secuenciados de *A. baumannii* y *A. pittii* (Siguiet *et al.*, 2006).

En la cepa HUMV 1319 se identificó una secuencia de inserción con elevada homología a ISPa42 de *P. aeruginosa*, perteneciente a la familia Tn3, cuya presencia se ve asociada a diversos genes de resistencia antibiótica (Partridge *et al.*, 2018).

En 2 cepas de *A. baumannii* (HUMV 2790 y HUMV 3743) se identificó la secuencia de inserción más estudiada de esta especie, IS*Aba1*. La presencia de esta secuencia de inserción se asocia con la resistencia a carbapenémicos por la sobreexpresión de los genes que flanquea, siendo los más comunes *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-51}*, *bla_{OXA-58}* y *ampC*, aunque también identificada en asociación con genes codificantes de EMAs como *aph(6)* (Holt *et al.*, 2016; Nowak y Paluchowska, 2016; Pagano *et al.*, 2016; Wright *et al.*, 2014; Wright *et al.*, 2017).

En 2 cepas de *A. pittii* (HUMV 0315 y HUMV 6483) y 1 de *A. baumannii* (HUMV 2471) se identificó la presencia de la secuencia de inserción IS*Aba125*, descrita por primera vez en *A. baumannii* y asociada su inserción con la inactivación de una porina de membrana

externa (Mussi *et al.*, 2005). Recientemente, su presencia se ha asociado con la duplicación del gen *bla_{OX4-58}* en una cepa de *A. pittii* así como en otra portadora de *bla_{NDM-1}* (Evans *et al.*, 2010; Pailhoriès *et al.*, 2016). Su localización suele verse asociada con la de los genes *bla_{NDM}*, *bla_{OX4}*, *ampC* y *aph(6)*, estando así relacionada con la resistencia a antibióticos β -lactámicos y aminoglucósidos (Wright *et al.*, 2014; Holt *et al.*, 2016; Pagano *et al.*, 2016).

En la cepa HUMV 6207 se identificó una secuencia de inserción con elevada homología a IS1236 descrita para *A. calcoaceticus* (Gerischer *et al.*, 1996).

En la cepa HUMV 5918 se identificó una secuencia de inserción con elevada homología a la secuencia IS*Aba13* descrita para *A. baumannii*, aunque de baja prevalencia (Wright *et al.*, 2017); recientemente hallada en otra cepa de una especie no identificada de *Acinetobacter* (Blaschke y Wilharm, 2017).

Las secuencias de inserción con más representación en este conjunto fueron IS*Aba1* e IS*Aba125*, lo que concuerda con los resultados de otros autores (Li *et al.*, 2015; Holt *et al.*, 2016; Pagano *et al.*, 2016).

iii. Mapeo de mutaciones

Si bien los principales mecanismos de resistencia en estas bacterias se asocian con la presencia de enzimas hidrolíticas o bombas de expulsión que eliminan los componentes del interior celular, existen otros mecanismos que colaboran en los fenotipos multirresistentes, como las mutaciones en las proteínas diana de los antibióticos. Este es el principal mecanismo de resistencia de las bacterias a quinolonas, cuyas dianas terapéuticas son la subunidad A de la ADN girasa (*gyrA*) y en la topoisomerasa IV (*parC*) (Gordon y Wareham, 2010; Peleg *et al.*, 2008). En *Acinetobacter*, como en otros microorganismos, estas mutaciones se concentran en la denominada región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR).

Dentro de las cepas secuenciadas y analizadas de *A. baumannii* se observó que todas las cepas clínicas del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla poseían la sustitución de aminoácido, como consecuencia de mutación en *gyrA*, Ser81Leu; mientras que la cepa de referencia ATCC 19606 mantenía el aminoácido serina en la posición 81, siendo el único aislado sensible al antibiótico ciprofloxacino. Del mismo modo, entre las cepas de *A. pittii*, solo HUMV 0315 mostró la sustitución Ser81Leu, asociándose con la resistencia de dicha bacteria al ciprofloxacino.

En lo referente al gen *parC*, 3 de las 5 cepas de *A. baumannii* (con excepción de la cepa de referencia y HUMV 2471) mostraron sustitución de aminoácido Ser84Leu, mientras que solo la cepa HUMV 2471 exhibió la sustitución Glu88Lys. Entre las cepas de *A. pittii*, como en el caso anterior, solo la cepa HUMV 0315 presentó la mutación Ser84Leu.

Las mutaciones en los genes *gyrA* y *parC* en las respectivas regiones QRDR en *A. baumannii* se describieron por primera vez en 1995 y 1997, respectivamente (Vila *et al.*, 1997; Vila *et al.*, 1995); aunque la mutación en *parC* con sustitución de aminoácido en la posición 88 (Glu88Lys), ha sido descrita por primera vez recientemente (Chan *et al.*, 2015). Dichas modificaciones en *gyrA* y *parC* han sido identificadas y relacionadas también con resistencia a quinolonas en *A. pittii* (Y. H. Liu *et al.*, 2012).

Las mutaciones en las proteínas diana de quinolonas han sido observadas en numerosos trabajos desde que fueron descritas por primera vez (Esterly *et al.*, 2011; Chan *et al.*, 2015; Holt *et al.*, 2016; Lean *et al.*, 2016; Ostrer *et al.*, 2019). No obstante, pese a estar bien establecida la relación de las mutaciones y las sustituciones de aminoácidos concretos con los fenotipos resistentes, al comparar los datos en la bibliografía existe un error en la terminología. Esto es debido a la utilización de la secuencia *E. coli* como referencia en el alineamiento, que desplaza la posición que corresponde a las modificaciones; sin embargo, esto se ve corregido en los trabajos más recientes.

En un estudio reciente se describió la relación entre las principales mutaciones de ambos genes, así como la prevalencia de las mismas entre cepas de *A. baumannii* (Ostrer *et al.*, 2019). En él vieron que la primera mutación que se observa es en *gyrA*, que lleva a cualquiera de las 2 descritas en *parC*, aunque la sustitución Ser84Leu es mucho más frecuente, siendo muy poco probable que se produzcan 2 mutaciones iniciales consecutivas en QRDR. Cualquiera de las mutaciones en *gyrA* o en *parC* parecen ser suficientes para aumentar los valores de CMI de los aislados a las quinolonas de tercera generación, ciprofloxacino y levofloxacino (Esterly *et al.*, 2011; Chan *et al.*, 2015; Ostrer *et al.*, 2019).

5. Identificación de plásmidos

Como ya se ha mencionado, especies patógenas de *Acinetobacter* spp. son relevantes por su persistencia ambiental y su alta tasa de resistencias. Los plásmidos, como elementos móviles, pueden acelerar la diseminación de determinantes genéticos entre los que se encuentran los genes de resistencia (Huang *et al.*, 2014; San Millan y MacLean, 2017). De hecho, la presencia de plásmidos genéticamente cercanos y cepas estrechamente relacionadas en áreas geográficamente dispersas resaltan la diseminación de dichos organismos y de sus plásmidos (Huang *et al.*, 2014).

Aunque *A. baumannii* es un patógeno importante en instalaciones sanitarias, la información disponible sobre los plásmidos de dicha especie es limitada; y prácticamente inexistente para *A. pittii*. Pese a que los plásmidos grandes han sido objeto de más estudio porque presentan muchos genes de resistencia y poseen la capacidad de autorreplicarse; los de menor tamaño pueden ser también portadores de genes de resistencia (Lean y Yeo, 2017). De hecho, un gran número de plásmidos de *A. baumannii* son significativamente pequeños (desde 2 kb), siendo estos de menor tamaño generalmente movilizables mientras que lo de mayor tamaño suelen ser conjugativos (Touchon *et al.*, 2014; Lean y Yeo, 2017).

La identificación y clasificación de plásmidos de *Acinetobacter* spp. se ha realizado mediante su secuenciación. En un trabajo reciente se agruparon los plásmidos de *A. baumannii* en grupos de homología basados en la secuencia de los genes codificantes para sus replicasas, estableciendo un total de 19 grupos (Bertini *et al.*, 2010). No obstante, a la vista de estudios posteriores, es probable que el esquema PBRT desarrollado por esos autores necesite ser revisado, debido al creciente número de secuencias de plásmidos de esta especie (Lean y Yeo, 2017).

En este trabajo se emplearon diferentes métodos para la identificación y clasificación de los plásmidos. En primer lugar, las cepas se sometieron a una digestión con la endonucleasa S1 para analizar el perfil PFGE orientado a la detección de plásmidos. No existen datos previos en la literatura de autores que hayan empleado esta técnica para la caracterización de plásmidos en *Acinetobacter*, aunque sí para definir los patrones PFGE del ADN cromosómico (Abbo *et al.*, 2005; Mancilla-Rojano *et al.*, 2019). Los resultados aquí obtenidos mostraron la presencia de 1 (HUMV 6207 y HUMV 6483) o 2 (HUMV 2471, HUMV 2790, HUMV3743 y HUMV 0315) plásmidos en algunas cepas tanto de *A. baumannii*

como de *A. pittii*. La limitación de esta técnica radica en la limitación en los tamaños de detección, ya que no es sensible para aquellos plásmidos pequeños.

En segundo lugar, mediante PCR con los *primers* diseñados por Bertini y colaboradores, se procedió a identificar los plásmidos pertenecientes a los distintos grupos de homología. Como se disponía previamente de los genomas secuenciados, se realizó un alineamiento previo con cada par de cebadores en todas las cepas para identificar aquellas positivas para cada tipo de plásmido. Posteriormente se comprobó la existencia de dichos plásmidos llevando a cabo la reacción PCR. Se obtuvieron coincidencias con plásmidos de 4 grupos de homología: ATCC 19606 plásmido GR8; HUMV 1319, HUMV 2471 y HUMV 2790 plásmido GR2; HUMV 3743 plásmido GR6; y HUMV 0315 GR3. Aunque los primers fueron diseñados para la identificación de plásmidos de *A. baumannii*, una de las cepas de *A. pittii* mostró poseer también un elemento descrito para dicha especie. Por su parte, la mayoría de las cepas de *A. baumannii* portaron plásmidos pertenecientes al GR2, el cual parece ser el más numeroso (Bertini *et al.*, 2010). Si bien este tipado es útil para la vigilancia de la circulación y la dispersión de plásmidos, y con ello de determinantes de resistencia, tiene algunas limitaciones (Bertini *et al.*, 2010). Quizá la principal limitación es la resolución, es decir, permite identificar el grupo de homología al que pertenece el plásmido pero no discernir el plásmido exacto entre ellos.

Tras la identificación de plásmidos mediante PCR, también se evaluó la estabilidad de los mismos, descrita por De Gelder y colaboradores como la presencia y detección del mismo tras 250 generaciones (De Gelder *et al.*, 2007). En todas las cepas con plásmidos detectados mediante productos de PCR se obtuvo la detección de los mismos superando el umbral descrito (en generaciones) para plásmidos estables. La estabilidad de los plásmidos en el tiempo se asocia con una mayor probabilidad de la transmisión de sus genes, a menudo asociados con la resistencia antimicrobiana (Partridge *et al.*, 2018; Stevenson *et al.*, 2018).

En tercer lugar, se empleó la secuenciación PacBio sobre algunas de las cepas de *A. pittii*, que permite cerrar los genomas y con ello predecir la presencia de plásmidos. Se seleccionaron solo cepas de esta especie con el objetivo de depositar genomas completos en la plataforma GenBank, ya que el número de estos es muy inferior a los existentes para *A. baumannii*. Se obtuvo la identificación de plásmidos en dos de las cepas, HUMV 6207 (100,37 kb) y HUMV 6483 (112,60 kb). Al comparar estos resultados con los obtenidos mediante PFGE se correlacionan perfectamente, ya que ambas cepas muestran una sola banda superior al marcador de 97 kb, siendo de mayor tamaño la de la última cepa. Las 2 cepas que solo

mostraron ADN cromosómico en la secuenciación (HUMV 4336 y HUMV 5918) también fueron negativas en el ensayo PFGE.

Por último, se empleó el software PLACNET para analizar la presencia de plásmidos en todos los genomas secuenciados mediante tecnología Illumina. Es importante señalar que este software requiere de un filtrado manual y análisis de los resultados que están sujetos a la interpretación subjetiva; además, los productos de la secuenciación pueden encontrarse fragmentados pudiendo verse comprometida la identificación de ciertas estructuras. A pesar de todo, se predijeron resultados bastante precisos en muchas de las cepas.

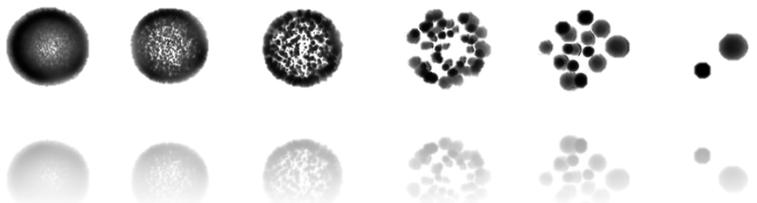
Dentro de las cepas de *A. baumannii*, la cepa de referencia ATCC 19606 mostró un plásmido de elevada similitud con el plásmido pMAC, previamente descrito para esa cepa y que corresponde al GR8, como había predicho el producto de PCR (Dorsey *et al.*, 2006). La cepa HUMV 1319 mostró la presencia de estructuras pertenecientes a pequeños plásmidos, lo que podría explicar por qué no fueron detectados mediante PFGE pero sí mediante PCR como elemento del GR2. La cepa HUMV 2471 mostró un pequeño plásmido identificado como pMMUC3, originariamente descrito en *A. calcoaceticus* (Merino *et al.*, 2010), que pertenece al GR12 pese a no ser detectado mediante PCR. En base al patrón de bandas de esta cepa y el tamaño de los plásmidos detectados en ella pudiera ser que varias de las estructuras que el programa detecta como independientes formaran parte de un plásmido de mayor tamaño, aunque predice uno de 69,2 kb que equivale a la banda de menor tamaño. En las cepas HUMV 2790 y HUMV 3743 se predijo la presencia de un plásmido de gran tamaño (superior a 100 kb) identificado como pABUH5-114, recientemente descrito (Wright *et al.*, 2014), que corresponde a la misma banda que ambas poseen por encima del marcador que corresponde a 97 kb.

Por otro lado, dentro de las cepas de *A. pittii*, la cepa HUMV 4336 no mostró ningún *contig* asociado a plásmidos, lo que concuerda tanto con los resultados obtenidos mediante secuenciación PacBio como con las bandas del PFGE. En la cepa HUMV 0315 se identificó un plásmido de más de 110 kb (corresponde a la banda superior en el gel PFGE) y otros de menor tamaño que, como sucedía con la cepa HUMV 2471 de *A. baumannii* pudieran formar parte del mismo elemento. Uno de esos fragmentos presentó homología con el plásmido pOIFC032-8.6, recientemente descrito en *A. baumannii* (Chan *et al.*, 2015). En base a los resultados obtenidos en la PCR, uno de los plásmidos debe pertenecer al GR3, pudiendo ser el identificado como plásmido de *A. baumannii* pero no incluido en la clasificación original porque ha sido descrito con posterioridad. Lo mismo sucedió con las cepas HUMV 6207 y

HUMV 6483, que predice 3 plásmidos para cada una, de tamaños comprendidos entre 10 y 60 kb aproximadamente, pero que muestran una banda única de más de 97 kb. Además, en estas cepas mediante secuenciación con tecnología SMRT se habían identificado plásmidos únicos de más de 100 kb en cada una de ellas. Uno de los fragmentos de la cepa HUMV 6483 mostró elevada similitud con el plásmido pMS32-1 descrito en *A. pittii* (Fu *et al.*, 2014).

A la vista de los datos obtenidos, la identificación de plásmidos en cepas de *A. baumannii* y a *A. pittii* puede realizarse desde distintos enfoques. El más preciso tanto para la identificación como para la caracterización pudiera ser la secuenciación mediante tecnología SMRT, aunque a la hora de analizar los resultados posee una tasa de error mayor y tiene un coste económico superior (Frey *et al.*, 2014). Debido a la limitación del esquema PBRT a la especie *A. baumannii*, además de la necesidad de actualización de los datos, en un método más sencillo pero también con una resolución menor (Bertini *et al.*, 2010; Lean y Yeo, 2017). Por último, el software PLACNET permite la predicción de plásmidos en productos de secuenciación Illumina que reduce los costes. No obstante, debido a la necesidad de un filtrado manual de los datos, para obtener resultados más parecidos sobre especies menos estudiadas, como estas del género *Acinetobacter*, es conveniente tener un apoyo visual como el que proporciona el patrón PFGE de ADN plasmídico.

CONCLUSIONES



A partir del trabajo presentado en esta Tesis Doctoral, hemos extraído las siguientes conclusiones:

Primera. *A. baumannii* y *A. pittii* en general son capaces de mantener una subpoblación viable de células tras varias semanas en condiciones de desecación (60 y 43 días, respectivamente), y apenas presentan disminución en la viabilidad en solución salina (privación de nutrientes).

Segunda. Las cepas analizadas de *A. baumannii* y *A. pittii* no presentan estado Viable No Cultivable, en las condiciones testadas.

Tercera. *A. baumannii* y *A. pittii* presentan un fenotipo cepa-específico y superficie-específico en lo que a formación de biofilm se refiere. En la mayoría de casos mantienen o incluso incrementan la cantidad de biofilm formado tras varias semanas bajo condiciones de estrés y/o desecación.

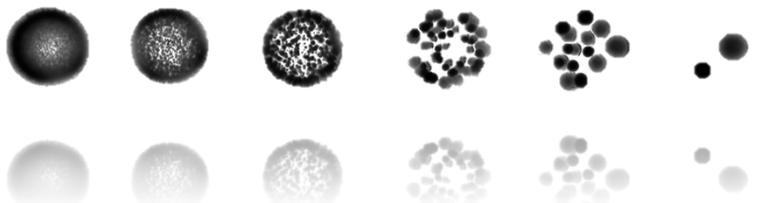
Cuarta. Las cepas analizadas de *A. baumannii* mantienen su virulencia incluso pasados 60 días en condiciones de estrés de privación de nutrientes.

Quinta. Las cepas analizadas de *A. baumannii* son en origen resistentes al suero humano. No obstante, su comportamiento varía en función de la cepa y de las condiciones de estrés a las que hayan sido expuestas, no perdiendo esta capacidad de resistir al suero humano incluso tras largos periodos de estrés.

Sexta. Las cepas de *Acinetobacter* spp. analizadas comparten una gran homología genómica, así como cercanía evolutiva. Además, presentan un gran arsenal de determinantes de resistencia.

Séptima. Todas las cepas de *A. baumannii* utilizadas en este trabajo, y la mayoría de *A. pittii* poseen al menos un plásmido en su genoma, y algunos de ellos permanecen estables al menos durante 250 generaciones.

BIBLIOGRAFÍA



- Abbas, S., Ahmed, I., Kudo, T., Iida, T., Ali, G.M., Fujiwara, T., y Okhuma, M. (2014). Heavy metal - tolerant and psychrotolerant bacterium *Acinetobacter pakistanensis* sp. nov. isolated from a textile dyeing wastewater treatment pond. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 51(3), 595–608.
- Abbo, A., Navon-Venezia, S., Hammer-Muntz, O., Krichali, T., Siegman-Igra, Y., y Carmeli, Y. (2005). Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Emerging Infectious Diseases*, 11(1), 22–29.
- Adams, M.D., Chan, E.R., Molyneaux, N.D., y Bonomo, R.A. (2010). Genomewide analysis of divergence of antibiotic resistance determinants in closely related isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(9), 3569–3577.
- Adams, M.D., Goglin, K., Molyneaux, N., Hujer, K.M., Lavender, H., Jamison, J.J., MacDonald, I.J., Martin, K.M., Russo, T., Campagnari, A.A., Hujer, A.M., Bonomo, R. A., y Gill, S.R. (2008). Comparative genome sequence analysis of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Bacteriology*, 190(24), 8053–8064.
- Alikhan, N.F., Petty, N.K., Ben Zacour, N.L., y Beatson, S.A. (2011). BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons. *BMC Genomics*, 12(402), 1–10.
- Álvarez-Pérez, S., Lievens, B., Jacquemyn, H., y Herrera, C.M. (2013). *Acinetobacter nectaris* sp. nov. and *Acinetobacter boissieri* sp. nov., isolated from floral nectar of wild Mediterranean insect-pollinated plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 1532–1539.
- Ambler, R. P. (1980). The structure of β -lactamases. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, 289(1036), 321–331.
- Anandham, R., Weon, H.Y., Kim, S.J., Kim, Y.S., Kim, B.Y., y Kwon, S.W. (2010). *Acinetobacter brisouii* sp. nov., isolated from a wetland in Korea. *Journal of Microbiology*, 48(1), 36–39.
- Andersson, D.I., y Hughes, D. (2011). Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(5), 901–911.
- Antipov, D., Hartwick, N., Shen, M., Raiko, M., y Pevzner, P.A. (2016). plasmidSPAdes : Assembling Plasmids from Whole. *BioRxiv*, 1–7.
- Antunes, L.C.S., Visca, P., y Towner, K.J. (2014). *Acinetobacter baumannii*: Evolution of a global pathogen. *Pathogens and Disease*, 71(3), 292–301.
- APIC. (2010). Guide to the Elimination of Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* Transmission in healthcare settings. *Apic Guide*.
- Atrouni, A.Al, Joly-Guillou, M.L., Hamze, M., y Kempf, M. (2016). Reservoirs of non-*baumannii* *Acinetobacter* species. *Frontiers in Microbiology*, 7(FEB), 1–12.
- Aziz, R.K., Bartels, D., Best, A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R.A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E.M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G.J., Olson, R., Osterman, A.L., Overbeek, R.A., McNeil, L.K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., Pusch, G.D., Reich, C., Stevens, R., Vassieva, O., Vonstein, V., Wilke, A., y Zagnitko, O. (2008). The RAST Server: Rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics*, 9, 1–15.
- Badave, G.K., y Dhananjay, K. (2015). Biofilm producing multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*: An emerging challenge. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 9(1), DC08–DC10.
- Bardbari, A.M., Arabestani, M.R., Karami, M., Keramat, F., Alikhani, M.Y., y Bagheri, K. P. (2017). Correlation between ability of biofilm formation with their responsible genes

- and MDR patterns in clinical and environmental *Acinetobacter baumannii* isolates. *Microbial Pathogenesis*, 108, 122–128.
- Baumann, P. (1968). Isolation of *Acinetobacter* from Soil and Water. *Journal of Bacteriology*, 96(1), 39–42.
- Baumann, P., Doudoroff, M., y Stanier, R. (1968). A Study of the Moraxellk Group II. Oxidative-negative Species (Genus *Acinetobacter*)?. *Journal of Bacteriology*, 95(5), 1520–1541.
- Beijerinck, M.W. (1911). Pigments as products of oxidation by bacterial action. *Proceedings of the Royal Academy of Sciences*, 13, 1066–1077.
- Benson, D.A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., y Sayers, E.W. (2017). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D37–D42.
- Bergogne-Bérézin, E., y Joly-Guillou, M.L. (1991). Hospital infection with *Acinetobacter* spp.: An increasing problem. *Journal of Hospital Infection*, 18(SUPPL. A), 250–255.
- Bergogne-Bérézin, E., y Towner, K. (1996). *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clinical Microbiology Reviews*, 9(2), 148–165.
- Berlau, J., Aucken, H.M., Houang, E., y Pitt, T.L. (1999). Isolation of *Acinetobacter* spp. including *A. baumannii* from vegetables: implications for hospital-acquired infections. *Journal of Hospital Infection*, 42(3), 201–204.
- Bertini, A., Poirel, L., Mugnier, P.D., Villa, L., Nordmann, P., y Carattoli, A. (2010). Characterization and PCR-based replicon typing of resistance plasmids in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(10), 4168–4177.
- Bhargava, N., Sharma, P., y Capalash, N. (2010). Quorum sensing in *Acinetobacter*: an emerging pathogen. *Critical Reviews in Microbiology*, 36(4), 349–360.
- Bialvaei, A.Z., Kafil, H.S., Leylabadlo, H.E., Asgharzadeh, M., y Aghazadeh, M. (2015). Dissemination of carbapenemases producing gram negative bacteria in the middle east. *Iranian Journal of Microbiology*, 7(5), 226–246.
- Blair, J.M., y Piddock, L.J. (2009). Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram-negative bacteria: an update. *Current Opinion in Microbiology*, 12(5), 512–519.
- Blair, J.M., Richmond, G.E., y Piddock, L.J.V. (2014). Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. *Future Microbiology*, 9(10), 1165–1177.
- Blaschke, U., y Wilharm, G. (2017). Complete Genome Sequence of *Acinetobacter* sp. Strain NCu2D-2 Isolated from a Mouse. *Genome Announcements*, 5(4), e01415-16.
- Bogaerts, P., Huang, T.D., Castro, R.R.De, Bouchahrouf, W., y Glupczynski, Y. (2013). Could *Acinetobacter pittii* act as an NDM-1 reservoir for Enterobacteriaceae? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(10), 2414–2415.
- Boll, J.M., Tucker, A.T., Klein, D.R., Beltran, A.M., Brodbelt, J.S., Davies, B.W., y Trent, M.S. (2015). Reinforcing lipid acylation on the cell surface of *Acinetobacter baumannii* promotes cationic antimicrobial peptide resistance and desiccation survival. *MBio*, 6(3), e00478-15.
- Boo, T.W., Walsh, F., y Crowley, B. (2009). Molecular characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter* species in an Irish university hospital: predominance of *Acinetobacter* genomic species 3. *Journal of Medical Microbiology*, 58, 209–216.
- Bouvet, P.J.M., y Grimont, P.A.D. (1986). Taxonomy of the Genus *Acinetobacter* with the

- Recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and Emended Descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 36(2), 228–240.
- Bravo, Z., Orruño, M., Parada, C., Kaberdin, V.R., Barcina, I., y Arana, I. (2016). The long-term survival of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606T under nutrient-deprived conditions does not require the entry into the viable but non-culturable state. *Archives of Microbiology*, 198(5), 399–407.
- Briggs, S., Ellis-Pegler, R., Raymond, N., Thomas, M., y Wilkinson, L. (2004). Gram-negative bacillary meningitis after cranial surgery of trauma in adults. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 36(3), 165–173.
- Brisou, J. (1957). Contribution à l'étude des Pseudomonadaceae. Précisions taxonomiques sur le genre *Acinetobacter*. *Annales de l'Institut Pasteur*, 92, 134–137.
- Brisou, J., y Prevot, A. (1954). Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under *Acromobacter* group. *Annales de l'Institut Pasteur*, 86(6), 722–728.
- Buxton, A.E., Anderson, R.L., Werdegar, D., y Atlas, E. (1978). Nosocomial respiratory tract infection and colonization with *Acinetobacter calcoaceticus*. Epidemiologic characteristics. *The American Journal of Medicine*, 65(3), 507–513.
- Cai, Y., Chai, D., Wang, R., Liang, B., y Bai, N. (2012). Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: Clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(7), 1607–1615.
- Calabrese, J.P., y Bissonnette, G.K. (1990). Improved detection of acid mine water stressed coliform bacteria on media containing catalase and sodium pyruvate. *Can J Microbiol*, 36(8), 544–550.
- Campos-Guillén, J., Caballero-Pérez, J., Cruz-Medina, J.A., Molina-Vera, C., Salas-Rosas, L. M., Limpens-Gutiérrez, C., García-Salinas, I., Hernández-Ramírez, M.R., Soto-Alonso, G., Cruz-Hernández, A., Saldaña-Gutiérrez, C., Romero-Gómez, S., Pastrana-Martínez, X., Álvarez-Hidalgo, E., Gosar, M., y Dizdarevic, T. (2014). Draft Genome Sequence of the Mercury-Resistant Bacterium *Acinetobacter idrijaensis* Strain MII, Isolated from a Mine-Impacted Area, Idrija, Slovenia. *Genome Announcements*, 2(6).
- Carattoli, A., Zankari, E., García-Fernández, A., Voldby Larsen, M., Lund, O., Villa, L., Moller-Aaerestrup, F., y Hasman, H. (2014). In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(7), 3895–3903.
- Carr, E.L., Kämpfer, P., Patel, B.K.C., Gürtler, V., y Seviour, R.J. (2003). Seven novel species of *Acinetobacter* isolated from activated sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(4), 953–963.
- Carraro, N., y Burrus, V. (2015). The dualistic nature of integrative and conjugative elements. *Mobile Genetic Elements*, 5(6), 98–102.
- Chan, A.P., Sutton, G., DePew, J., Krishnakumar, R., Choi, Y., Huang, X.Z., Beck, E., Harkins, D.M., Kim, M., Lesho, E.P., Nikolich, M.P., y Fouts, D. E. (2015). A novel method of consensus pan-chromosome assembly and large-scale comparative analysis reveal the highly flexible pan-genome of *Acinetobacter baumannii*. *Genome Biology*, 16(143), 1–28.
- Chang, H. C., Wei, Y.F., Dijkshoorn, L., Vaneechoutte, M., Tang, C.T., y Chang, T.C. (2005). Species-Level Identification of Isolates of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter*

- baumannii* Complex by Sequence Analysis of the 16S-23S rRNA Gene Spacer Region. *Society*, 43(4), 1632–1639.
- Chatterjee, S., Mondal, A., Mitra, S., y Basu, S. (2017). *Acinetobacter baumannii* transfers the blaNDM-1 gene via outer membrane vesicles. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(8), 2201–2207.
- Chaudhary, H.J., Peng, G., Hu, M., He, Y., Yang, L., Luo, Y., y Tan, Z. (2012). Genetic diversity of endophytic diazotrophs of the wild rice, *Oryza alta* and identification of the new diazotroph, *Acinetobacter oryzae* sp. nov. *Microbial Ecology*, 63(4), 813–821.
- Chemaly, R.F., Simmons, S., Dale, C., Ghantaji, S.S., Rodriguez, M., Gubb, J., Stachowiak, J., y Stibich, M. (2014). The role of the healthcare environment in the spread of multidrug-resistant organisms: update on current best practices for containment. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, 2(3–4), 79–90.
- Chen, L., Yuan, J., Xu, Y., Zhang, F., y Chen, Z. (2018). Comparison of clinical manifestations and antibiotic resistances among three genospecies of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *PLoS ONE*, 13(2), 1–11.
- Chin, C.S., Alexander, D.H., Marks, P., Klammer, A.A., Drake, J., Heiner, C., Clum, A., Copeland, A., Huddleston, J., Eichler, E.E., Turner, S.W., y Korlach, J. (2013). Nonhybrid, finished microbial genome assemblies from long-read SMRT sequencing data. *Nature Methods*, 10(6), 563–569.
- Choi, C.H., Lee, E.Y., Lee, Y.C., Park, T.I., Kim, H.J., Hyun, S.H., Kim, S.A., Lee, S.K., y Lee, J.C. (2005). Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. *Cellular Microbiology*, 7(8), 1127–1138.
- Choi, C.H., Lee, J.S., Lee, Y.C., Park, T.I., y Lee, J.C. (2008). *Acinetobacter baumannii* invades epithelial cells and outer membrane protein A mediates interactions with epithelial cells. *BMC Microbiology*, 8, 1–11.
- Choi, J.Y., Ko, G., Jheong, W., Huys, G., Seifert, H., Dijkshoorn, L., y Ko, K.S. (2013). *Acinetobacter kookii* sp. nov., isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(PART 12), 4402–4406.
- Chuang, Y.C., Sheng, W.H., Li, S.Y., Lin, Y.C., Wang, J.T., Chen, Y.C., y Chang, S.C. (2011). Influence of genospecies of *Acinetobacter baumannii* complex on clinical outcomes of patients with *Acinetobacter* bacteremia. *Clinical Infectious Diseases*, 52(3), 352–360.
- Chusri, S., Chongsuvivatwong, V., Rivera, J.I., Silpapojakul, K., Singkhamanan, K., McNeil, E., y Doi, Y. (2014). Clinical outcomes of hospital-acquired infection with *Acinetobacter nosocomialis* and *Acinetobacter pittii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(7), 4172–4179.
- Cisneros-Herreros, J.M., Garnacho-Montero, J., y Pachón-Ibáñez, M.E. (2005). Neumonía nosocomial por *Acinetobacter baumannii*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 23(SUPPL.3), 46–51.
- Cisneros, J.M., Reyes, M.J., Pachon, J., Becerril, B., Caballero, F.J., Garcia Garmendia, J.L., Ortiz, C., y Cobacho, A.R. (1996). Bacteremia Due to *Acinetobacter baumannii*: Epidemiology, Clinical Findings, and Prognostic Features. *Clinical Infectious Diseases*, 22(6), 1026–1032.
- CLSI. (2018). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. *CLSI Supplement M100* (28th ed.). Wayne, Pensilvania: Clinical and Laboratory Standards Institute.

- Cock, P.J.A., Antao, T., Chang, J.T., Chapman, B. A., Cox, C.J., Dalke, A., Friedberg, I., Hamelryck, T., Kauff, F., Wilczynski, B., y De Hoon, M.J.L. (2009). Biopython: Freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. *Bioinformatics*, 25(11), 1422–1423.
- Coenye, T., Gevers, D., Van de Peer, Y., Vandamme, P., y Swings, J. (2005). Towards a prokaryotic genomic taxonomy. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(2), 147–167.
- Cooper, R. M., Tsimring, L., y Hasty, J. (2017). Inter-species population dynamics enhance microbial horizontal gene transfer and spread of antibiotic resistance. *ELife*, 6.
- Cosgaya, C., Mari-Almirall, M., Van Assche, A., Fernández-Orth, D., Mosqueda, N., Telli, M., Huys, G., Higgins, P.G., Seifert, H., Lievens, B., Roca, I., y Vila, J. (2016). *Acinetobacter dijkschoorniae* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* complex mainly recovered from clinical samples in different countries. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(10), 4105–4111.
- Costello, S.E., Deshpande, L.M., Davis, A.P., Mendes, R.E., y Castanheira, M. (2019). Aminoglycoside-modifying enzyme and 16S ribosomal RNA methyltransferase genes among a global collection of Gram-negative isolates. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 16, 278–285.
- Coyne, S., Courvalin, P., y Périchon, B. (2011). Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(3), 947–953.
- Dahal, R.H., Chaudhary, D.K., y Kim, J. (2017). *Acinetobacter halotolerans* sp. nov., a novel halotolerant, alkalitolerant, and hydrocarbon degrading bacterium, isolated from soil. *Archives of Microbiology*, 199(5), 701–710.
- De Gelder, L., Ponciano, J.M., Joyce, P., y Top, E.M. (2007). Stability of a promiscuous plasmid in different hosts: No guarantee for a long-term relationship. *Microbiology*, 153, 452–463.
- De Gregorio, E., Del Franco, M., Martinucci, M., Roschetto, E., Zarrilli, R., y Di Nocera, P. P. (2015). Biofilm-associated proteins: news from *Acinetobacter*. *BMC Genomics*, 16, 933.
- Deurenberg, R.H., Bathoorn, E., Chlebowicz, M.A., Couto, N., Ferdous, M., García-Cobos, S., Kooistra-Smid, A.M.D., Raangs, E.C., Rosema, S., Veloo, A.C.M., Zhou, K., Friedrich, A.W., y Rossen, J.W.A. (2017). Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention. *Journal of Biotechnology*, 250, 2–10.
- Di Nocera, P.P., Rocco, F., Giannouli, M., Triassi, M., y Zarrilli, R. (2011). Genome organization of epidemic *Acinetobacter baumannii* strains. *BMC Microbiology*, 11(224), 1–17.
- Dijkshoorn, L., Nemec, A., y Seifert, H. (2007). An increasing threat in hospitals: Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nature Reviews Microbiology*, 5(12), 939–951.
- Dijkshoorn, L., van Aken, E., Shunburne, L., van der Reijden, T.J.K., Bernards, A.T., Nemec, A., y Towner, K.J. (2005). Prevalence of *Acinetobacter baumannii* and other *Acinetobacter* spp. in faecal samples from non-hospitalised individuals. *Clinical Microbiology and Infection*, 11(4), 329–332.
- Dijkshoorn, L., Van Harselaar, B., Tjernberg, I., Bouvet, P.J.M., y Vanechoutte, M. (1998). Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis for identification of *Acinetobacter* genomic species. *Systematic and Applied Microbiology*, 21(1), 33–39.
- Doi, Y., Murray, G.L., y Peleg, A.Y. (2015). *Acinetobacter baumannii*: evolution of antimicrobial resistance-treatment options. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 36(1), 85–98.

- Doll, M., Stevens, M., y Bearman, G. (2018). International Journal of Infectious Diseases Environmental cleaning and disinfection of patient areas. *International Journal of Infectious Diseases*, 67, 52–57.
- Dorsey, C.W., Tomaras, A.P., y Actis, L.A. (2006). Sequence and organization of pMAC, an *Acinetobacter baumannii* plasmid harboring genes involved in organic peroxide resistance. *Plasmid*, 56(2), 112–123.
- Du, D., Wang-Kan, X., Neuberger, A., van Veen, G.W., Pos, K.M., Piddock, L.J., y Luisi, B.F. (2018). Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. *Nature Reviews Microbiology*, 16(9), 523–539.
- Du, J., Singh, H., Yu, H., Jin, F.X., y Yi, T.H. (2016). *Acinetobacter plantarum* sp. nov. isolated from wheat seedlings plant. *Archives of Microbiology*, 198(5), 393–398.
- Ducret, A., Chabalier, M., y Dukan, S. (2014). Characterization and resuscitation of “non-culturable” cells of *Legionella pneumophila*. *BMC Microbiology*, 14(1).
- ECDC. (2016). Expert opinion on whole genome sequencing for public health surveillance. *ECDC*, 612–617.
- Ecker, J. A., Massire, C., Hall, T. A., Ranken, R., Pennella, T. T. D., Ivy, C. A., Blyn, L.B., Hofstadler, S.A., Endy, T.P., Scott, P.T., Lindler, L. Hamilton, T., Gaddy, C., Snow, K., Pe, M., Fishbain, J., Craft, D., Deye, G., Riddell, S., Milstrey, E., Petruccielli, B., Brisse, S., Harpin, V., Schink, A., Ecker, D.J., Sampath, R., y Eshoo, M. W. (2006). Identification of *Acinetobacter* species and genotyping of *Acinetobacter baumannii* by multilocus PCR and mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(8), 2921–2932.
- Ekmekci, B., McAnany, C.E., y Mura, C. (2016). An Introduction to Programming for Bioscientists: A Python-Based Primer. *PLoS Computational Biology*, 12(6), 1–43.
- Espinal, P., Martí, S., y Vila, J. (2012). Effect of biofilm formation on the survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *Journal of Hospital Infection*, 80, 56–60.
- Esterly, J.S., Richardson, C.L., Eltoukhy, N.S., Qi, C., y Scheetz, M.H. (2011). Genetic mechanisms of antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumannii*. *Annals of Pharmacotherapy*, 45(2), 218–228.
- EUCAST. 2018. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.1. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*.
- Euzéby, J. (2011). List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61, 1499–1501.
- Evans, B.A., y Amyes, S.G.B. (2014). OXA β -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(2), 241–263.
- Evans, B.A., Hamouda, A., Towner, K.J., y Amyes, S.G.B. (2008). OXA-51-like β -lactamases and their association with particular epidemic lineages of *Acinetobacter baumannii*. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(3), 268–275.
- Evans, B., Hamouda, A., Towner, K., y Amyes, S. (2010). Novel genetic context of multiple blaOXA-58 genes in *Acinetobacter* genospecies 3. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(8), 1586–1588.
- Farrow, J.M., Wells, G., y Pesci, E.C. (2018). Desiccation tolerance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by the two-component response regulator BfmR. *PLoS ONE*, 13(10), 1–25.
- Feng, G.D., Yang, S.Z., Wang, Y.H., Deng, M.R., y Zhu, H.H. (2014). *Acinetobacter*

- guangdongensis* sp. nov., isolated from abandoned lead-zinc ore. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(Pt 10), 3417–3421.
- Feng, G., Yang, S., Wang, Y., Yao, Q., y Zhu, H. (2014). *Acinetobacter refrigerantis* [corrected] sp. nov., isolated from a domestic refrigerator. *Current Microbiology*, 69(6), 888–893.
- Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R., Bult, C.J., Tomb, J.F., Dougherty, D.A., y Merrick, J.M. (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*, 269(5223), 496–512.
- Flemming, H.C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S.A., y Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews. Microbiology*, 14(9), 563–575.
- Flores-Fernández, E., Bermúdez-Marval, M., Salazar, E., y Albarado-Ysasis, L. (2017). Características morfo-tintoriales en el ciclo celular de *Acinetobacter baumannii* por los métodos de Gram y 4',6-diamidino-2'-fenilindol, dihidrocloruro. *Saber*, 29, 628–640.
- Fournier, P.E., Vallenet, D., Barbe, V., Audic, S., Ogata, H., Poirel, L., Richet, H., Robert, C., Mangenot, S., Abergel, C., Nordmann, P., Weissenbach, J., Raoult, D., y Claverie, J.-M. (2006). Comparative Genomics of Multidrug Resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Genetics*, 2(1), e7.
- Fournier, P.E., y Richet, H. (2006). The Epidemiology and Control of *Acinetobacter baumannii* in Health Care Facilities. *Healthcare Epidemiology*, 42, 692–699.
- Fouts, D.E., Brinkac, L., Beck, E., Inman, J., y Sutton, G. (2012). PanOCT: Automated clustering of orthologs using conserved gene neighborhood for pan-genomic analysis of bacterial strains and closely related species. *Nucleic Acids Research*, 40(22), 1–11.
- Fredrickson, J.K., Li, S. W., Gaidamakova, E.K., Matrosova, V.Y., Zhai, M., Sulloway, H.M., Scholten, J.C., Brown, M.G., Balkwill, D., y Daly, M.J. (2008). Protein oxidation: key to bacterial desiccation resistance? *The ISME Journal*, 2(4), 393–403.
- Frey, K.G., Herrera-Galeano, J.E., Redden, C.L., Luu, T.V., Servetas, S.L., Mateczun, A. J., Mokashi, V.P., y Bishop-Lilly, K.A. (2014). Comparison of three next-generation sequencing platforms for metagenomic sequencing and identification of pathogens in blood. *BMC Genomics*, 15(1), 1–14.
- Fu, Y., Jiang, J., Zhou, H., Jiang, Y., Fu, Y., Yu, Y., y Zhou, J. (2014). Characterization of a novel plasmid type and various genetic contexts of bla OXA-58 in *Acinetobacter* spp. from multiple cities in China. *PloS One*, 9(1), e84680.
- Gaddy, J.A., Actis, L.A., Arivett, B.A., Mcconnell, M.J., Rafael, L.R., y Pachón, J. (2012). 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. *Infection and Immunity*, 80(3), 1015–1024.
- Gaddy, J., y Actis, L. (2009). Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Future Microbiology*, 4(3), 273–278.
- García-Romero, I., Santero Santurino, E., y Floriano Pardo, B. (2017). *Análisis del genoma de Sphingopyxis granulí stirpe TFA y caracterización de un nuevo elemento regulador de los genes de degradación de tetralina* (Tesis Doctoral). Universidad Pablo De Olavide, Sevilla.
- Gayoso, C.M., Mateos, J., Méndez, J.A., Fernández-Puente, P., Rumbo, C., Tomás, M., Martínez-De Ilarduya, O., y Bou, G. (2014). Molecular mechanisms involved in the response to desiccation stress and persistence in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Proteome Research*.
- Gerischer, U., D'Argenio, D.A., y Ornston, L.N. (1996). IS1236, a newly discovered member of the IS3 family, exhibits varied patterns of insertion into the *Acinetobacter calcoaceticus*

- chromosome. *Microbiology*, 142(7), 1825–1831.
- Gerner-Smidt, P. (1992). Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* Complex, 30(10), 2680–2685.
- Goic-Barisic, I., Seruga Music, M., Kovacic, A., Tonkic, M., y Hrenovic, J. (2016). Pan Drug-Resistant Environmental Isolate of *Acinetobacter baumannii* from Croatia. *Microbial Drug Resistance*, mdr.2016.0229.
- Gordon, N.C., y Wareham, D.W. (2010). Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35(3), 219–226.
- Goris, J., Konstantinidis, K.T., Klappenbach, J.A., Coenye, T., Vandamme, P., y Tiedje, J. M. (2007). DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(1), 81–91.
- Greene, C., Vadlamudi, G., Newton, D., Foxman, B., y Xi, C. (2016). The influence of biofilm formation and multidrug resistance on environmental survival of clinical and environmental isolates of *Acinetobacter baumannii*. *American Journal of Infection Control*, 44(5), e65–e71.
- Grüning, B., Dale, R., Sjödin, A., Chapman, B.A., Rowe, J., Tomkins-Tinch, C.H., Valieris, R., y Köster, J. (2018). Bioconda: Sustainable and comprehensive software distribution for the life sciences. *Nature Methods*, 15(7), 475–476.
- Gundi, V., Dijkshoorn, L., Burignat, S., Raoult, D., y La Scola, B. (2009). Validation of partial rpoB gene sequence analysis for the identification of clinically important and emerging *Acinetobacter* species. *Microbiology*, 155(7), 2333–2341.
- Hamzah, B.M., y Sudhakar, M. (2015). Plasmid stability and maintenance of copy number using natural marker. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 3(2320). 368-377
- Henriksen, S. D. (1973). *Moraxella*, *Acinetobacter*, and the *Mimeae*. *Bacteriological Reviews*, 37(4), 522–561.
- Hernando-Amado, S., Blanco, P., Alcalde-Rico, M., Corona, F., Reales-Calderón, J.A., Sánchez, M.B., y Martínez, J.L. (2016). Multidrug efflux pumps as main player in intrinsic and acquired resistance to antimicrobials. *Drug Resistance Updates*, 28(2016), 1–77.
- Higgins, P.G., Lehmann, M., Wisplinghoff, H., y Seifert, H. (2010). gyrB multiplex PCR to differentiate between *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter* genomic species 3. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(12), 4592–4594.
- Higgins, P.G., Wisplinghoff, H., Krut, O., y Seifert, H. (2007). A PCR-based method to differentiate between *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomic species 13TU. *Clinical Microbiology and Infection*, 13(12), 1200–1201.
- Holt, K., Kenyon, J.J., Hamidian, M., Schultz, M.B., Pickard, D.J., Dougan, G., y Hall, R. (2016). Five decades of genome evolution in the globally distributed, extensively antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* global clone 1. *Microbial Genomics*, 2(2), e000052.
- Horrevorts, A., Bergman, K., Kollee, L., Breuker, I., Tjernberg, I., y Dijkshoorn, L. (1995). Clinical and epidemiological investigations of *Acinetobacter* genomospecies 3 in a neonatal intensive care unit. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(6), 1567–1572.
- Hou, C., y Yang, F. (2015). Drug-resistant gene of blaOXA-23, blaOXA-24, blaOXA-51 and

- blaOXA-58 in *Acinetobacter baumannii*. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(8), 13859–13863.
- Houang, E.T.S., Sormunen, R.T., Lai, L., Chan, C.Y., y Leong, A.S.Y. (1998). Effect of desiccation on the ultrastructural appearances of *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter lwoffii*. *Journal of Clinical Pathology*, 51, 786–788.
- Howard, A., O'Donoghue, M., Feeney, A., y Sleator, R. D. (2012). *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. *Virulence*, 3(3), 243–250.
- Hu, Y., Feng, Y., Qin, J., Radolfova-Krizova, L., Maixnerova, M., Zhang, X., Nemeč, A., y Zong, Z. (2018). *Acinetobacter wubouensis* sp. nov., isolated from hospital sewage. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(10), 3212–3216.
- Hu, Y., Feng, Y., Zhang, X., y Zong, Z. (2017). *Acinetobacter defluvii* sp. nov., recovered from hospital sewage. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(6), 1709–1713.
- Huang, H., Dong, Y., Yang, Z.L., Luo, H., Zhang, X., y Gao, F. (2014). Complete Sequence of pABTJ2, A Plasmid from *Acinetobacter baumannii* MDR-TJ, Carrying Many Phage-like Elements. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 12, 172–177.
- Hung, K.H., Wang, M.C., Huang, A.H., Yan, J.J., y Wu, J.J. (2012). Heteroresistance to cephalosporins and penicillins in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(3), 721–726.
- Hyatt, D., Chen, G.L., Locascio, P.F., Land, M.L., Larimer, F.W., y Hauser, L.J. (2010). Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics*, 11, 119.
- Jacobs, A.C., Hood, I., Boyd, K.L., Olson, P.D., Morrison, J.M., Carson, S., Sayood, K., Iwen, P.C., Skaar, E.P., y Dunman, P. M. (2010). Inactivation of phospholipase D diminishes *Acinetobacter baumannii* pathogenesis. *Infection and Immunity*, 78(5), 1952–1962.
- James, G.A., Korber, D.R., Caldwell, D.E., y Costerton, A.J.W. (1995). Digital Image Analysis of Growth and Starvation Responses of a Surface-Colonizing *Acinetobacter* sp. *Journal of Bacteriology*, 177(4), 907–915.
- Janssen, P., Maquelin, K., Coopman, R., Tjernberg, I., Bouvet, P., Kersters, K., y Dijkshoorn, L. (1997). Discrimination of *Acinetobacter* Genomic Species by AFLP Fingerprinting. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(4), 1179–1187.
- Jawad, A., Heritage, J., y Snelling, A.M. (1996). Influence of relative humidity and suspending menstrua on survival of *Acinetobacter* spp. on dry surfaces. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(12), 2881–2887.
- Jawad, A., Seifert, H., Snelling, A.M., Heritage, J., y Hawkey, P.M. (1998). Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(7), 1938–1941.
- Jawad, A., Snelling, A.M., Heritage, J., y Hawkey, P.M. (1998). Exceptional desiccation tolerance of *Acinetobacter radioresistens*. *Journal of Hospital Infection*, 39, 235–240.
- Jin, J.S., Kwon, S.O., Moon, D.C., Gurung, M., Lee, J.H., Kim, S.I., y Lee, J.C. (2011). *Acinetobacter baumannii* Secretes Cytotoxic Outer Membrane Protein A via Outer Membrane Vesicles. *PLoS ONE*, 6(2), e17027.
- Johani, K., Abualsaud, D., Costa, D.M., Hu, H., Whiteley, G., Deva, A., y Vickery, K. (2017). Characterization of microbial community composition, antimicrobial resistance and biofilm on intensive care surfaces. *Journal of Infection and Public Health*, 11(3), 418–424.

- Joly-Guillou, M.L. (2005). Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. *Clinical Microbiology and Infection*, 11(11), 868–873.
- Kamolvit, W., Derrington, P., Paterson, D.L., y Sidjabat, H.E. (2015). A case of IMP-4-, OXA-421-, OXA-96-, and CARB-2-producing *Acinetobacter pittii* sequence type 119 in Australia. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(2), 727–730.
- Kamolvit, W., Higgins, P.G., Paterson, D.L., y Seifert, H. (2014). Multiplex PCR to detect the genes encoding naturally occurring oxacillinases in *Acinetobacter* spp. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(4), 959–963.
- Kang, Y.S., Jung, J., Jeon, C.O., y Park, W. (2011). *Acinetobacter oleivorans* sp. nov. is capable of adhering to and growing on diesel-oil. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*, 49(1), 29–34.
- Karaïskos, I., Souli, M., Galani, I., y Giamarellou, H. (2017). Colistin: still a lifesaver for the 21st century? *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 13(1), 59–71.
- Karlin, S. (2001). Detecting anomalous gene clusters and pathogenicity islands in diverse bacterial genomes. *Trends in Microbiology*, 9(7), 335–343.
- Kavanagh, K., y Reeves, E.P. (2004). Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens, 28, 101–112.
- Khan, S.N., y Khan, A.U. (2016). Breaking the spell: Combating multidrug resistant “superbugs.” *Frontiers in Microbiology*, 7(174), 1–11.
- Kilic, A., Li, H., Mellmann, A., Basustaoglu, A. C., Kul, M., Senses, Z., Aydogan, H., Stratton, C.W., Harmsen, D., y Tang, Y.W. (2008). *Acinetobacter septicus* sp. nov. association with a nosocomial outbreak of bacteremia in a neonatal intensive care unit. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(3), 902–908.
- Kim, P.S., Shin, N.R., Kim, J.Y., Yun, J.H., Hyun, D.W., y Bae, J.W. (2014). *Acinetobacter apis* sp. nov., isolated from the intestinal tract of a honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Microbiology*, 52(8), 639–645.
- Kim, S.W., Choi, C.H., Moon, D.C., Jin, J. S., Lee, J.H., Shin, J.H., Kim, J.M., Lee, Y. C., Seol, S.Y., Cho, D.T., y Lee, J.C. (2009). Serum resistance of *Acinetobacter baumannii* through the binding of factor H to outer membrane proteins. *FEMS Microbiology Letters*, 301(2), 224–231.
- King, L.B., Swiatlo, E., Swiatlo, A., y McDaniel, L.S. (2009). Serum resistance and biofilm formation in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 55(3), 414–421.
- Kirchner, M., AbuOun, M., Mafura, M., Bagnall, M., Hunt, T., Thomas, C., Weile, J., y Anjum, M.F. (2013). Cefotaxime resistant *Escherichia coli* collected from a healthy volunteer; Characterisation and the effect of plasmid loss. *PLoS ONE*, 8(12), 8–15.
- Koh, T.H., Sng, L.H., Wang, G.C.Y., Hsu, L.Y., y Zhao, Y. (2007). IMP-4 and OXA beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii* from Singapore. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(4), 627–632.
- Kolbe, D.L., y Eddy, S.R. (2011). Fast filtering for RNA homology search. *Bioinformatics*, 27(22), 3102–3109.
- Köser, C.U., Ellington, M.J., Cartwright, E.J.P., Gillespie, S.H., Brown, N.M., Farrington, M., Holden, M.T.G., Dougan, G., Bentley, S.D., Parkhill, J., y Peacock, S.J. (2012). Routine use of microbial whole genome sequencing in diagnostic and public health microbiology. *PLoS Pathogens*, 8(8), e1002824.

- Krizova, L., Dijkshoorn, L., y Nemeč, A. (2011). Diversity and evolution of AbaR genomic resistance islands in *Acinetobacter baumannii* strains of European clone I. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(7), 3201–3206.
- Krizova, L., Maixnerova, M., Sedo, O., y Nemeč, A. (2014). *Acinetobacter bohemicus* sp. nov. widespread in natural soil and water ecosystems in the Czech Republic. *Systematic and Applied Microbiology*, 37(7), 467–473.
- Krizova, L., Maixnerova, M., Sedo, O., y Nemeč, A. (2015). *Acinetobacter albensis* sp. nov., isolated from natural soil and water ecosystems. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(11), 3905–3912.
- Krizova, L., McGinnis, J., Maixnerova, M., Nemeč, M., Poire, L., Mingle, L., Sedo, O., Wolfgang, W., y Nemeč, A. (2015). *Acinetobacter variabilis* sp. nov. (formerly DNA group 15 sensu Tjernberg y Ursing), isolated from humans and animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(3), 857–863.
- Kumar, S., Stecher, G., y Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870–1874.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B., y Nei, M. (2002). MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics*, 17(12), 1244–1245.
- Kurcik-Trajkovska, B. (2009). *Acinetobacter* spp. - A serious enemy threatening hospitals worldwide. *Macedonian Journal of Medical Sciences*, 2(2), 157–162.
- Kvist, M., Hancock, V., y Klemm, P. (2008). Inactivation of efflux pumps abolishes bacterial biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(23), 7376–7382.
- La Forgia, C., Franke, J., Hacek, D.M., Thomson, R.B., Robicsek, A., y Peterson, L.R. (2010). Management of a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak in an intensive care unit using novel environmental disinfection: A 38-month report. *American Journal of Infection Control*, 38(4), 259–263.
- La Scola, B., y Raoult, D. (2004). *Acinetobacter baumannii* in human body louse. *Emerging Infectious Diseases*, 10(9), 1671–1673.
- Lagesen, K., Hallin, P., Rodland, E.A., Staerfeldt, H.H., Rognes, T., y Ussery, D.W. (2007). RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. *Nucleic Acids Research*, 35(9), 3100–3108.
- Land, M., Hauser, L., Jun, S.R., Nookaew, I., Leuze, M.R., Ahn, T.H., Karpinets, T., Lund, O., Kora, G., Wassenaar, T., Poudel, S., y Ussery, D. W. (2015). Insights from 20 years of bacterial genome sequencing. *Functional y Integrative Genomics*, 15(2), 141–161.
- Lanza, V.F., de Toro, M., Garcillán-Barcia, M.P., Mora, A., Blanco, J., Coque, T.M., y de la Cruz, F. (2014). Plasmid Flux in Analyzed by Plasmid Constellation Network (PLACNET), a *Escherichia coli* ST131 Sublineages, New Method for Plasmid Reconstruction from Whole Genome Sequences. *PLoS Genetics*, 10(12).
- Laslett, D., y Canback, B. (2004). ARAGORN, a program to detect tRNA genes and tmRNA genes in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Research*, 32(1), 11–16.
- Lázaro-Díez, M., Navascués-Lejarza, T., Remuzgo-Martínez, S., Navas, J., Icardo, J.M., Acosta, F., Martínez-Martínez, L., y Ramos-Vivas, J. (2016). *Acinetobacter baumannii* and *A. pittii* clinical isolates lack adherence and cytotoxicity to lung epithelial cells in vitro. *Microbes and Infection*, 18(9), 559–564.
- Lean, S.S., y Yeo, C.C. (2017). Small, enigmatic plasmids of the nosocomial pathogen, *Acinetobacter baumannii*: Good, bad, who knows? *Frontiers in Microbiology*, 8(1547), 1-8.

- Lean, S.S., Yeo, C.C., Suhaili, Z., y Thong, K.L. (2016). Comparative genomics of two ST 195 carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* with different susceptibility to polymyxin revealed underlying resistance mechanism. *Frontiers in Microbiology*, 6(1445), 1–17.
- Lee, H.J., y Lee, S.S. (2010). *Acinetobacter kyonggiensis* sp. nov., a beta-glucosidase-producing bacterium, isolated from sewage treatment plant. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*, 48(6), 754–759.
- Lee, H., Koh, Y.M., Kim, J., Lee, J.C., Lee, Y.C., Seol, S.Y., y Cho, D.T. (2007). Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(1), 49–54.
- Lee, J.S., Lee, K.C., Kim, K.K., Hwang, I.C., Jang, C., Kim, N.G., Yeo, W.H., Kim, B.S., Yu, Y.M., y Ahn, J.S. (2009). *Acinetobacter antiviralis* sp. nov., from tobacco plant roots. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(3), 250–256.
- Lee, Y.C., Huang, Y.T., Tan, C.K., Kuo, Y.W., Liao, C.H., Lee, P.I., y Hsueh, P.R. (2011). *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genospecies 13TU and 3 bacteraemia: Comparison of clinical features, prognostic factors and outcomes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(8), 1839–1846.
- Lessel, E. (1971). International Committee on Nomenclature of Bacteria Subcommittee on the Taxonomy of *Moraxella* and Allied Bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 21(2), 213–214.
- Li, H., Liu, F., Zhang, Y., Wang, X., Zhao, C., Chen, H., Zhang, F., Zhu, B., Hu, Y., y Wang, H. (2015). Evolution of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* revealed through whole-genome sequencing and comparative genomic analysis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(2), 1168–1176.
- Li, W., Zhang, D., Huang, X., y Qin, W. (2014). *Acinetobacter barbinensis* sp. nov., isolated from river water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 1507–1513.
- Li, X.Z., Livermore, D.M., y Nikaido, H. (1994). Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: active efflux as a contributing factor to b-lactam resistance, 38(8), 1732–1741.
- Li, Y., He, W., Wang, T., Piao, C.G., Guo, L.M., Chang, J.P., Guo, M.G., y Xie, S.J. (2014). *Acinetobacter qingfengensis* sp. nov., isolated from canker bark of *Populus × euramericana*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 1043–1050.
- Li, Y., Piao, C.G., Ma, Y.C., He, W., Wang, H.M., Chang, J.P., Guo, L.M., Wang, X.Z., Xie, S.J., y Guo, M.W. (2013). *Acinetobacter puyangensis* sp. nov., isolated from the healthy and diseased part of *Populus × euramericana* canker bark. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 2963–2969.
- Lin, M.F., y Lan, C.Y. (2014). Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From bench to bedside. *World Journal of Clinical Cases*, 2(12), 787.
- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L., y Law, M. (2012). Comparison of next-generation sequencing systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012.
- Liu, S., Wang, Y., Ruan, Z., Ma, K., Wu, B., Xu, Y., Wang, J., You, Y., He, M., y Hu, G. (2017). *Acinetobacter larvae* sp. nov., isolated from the larval gut of *Omphisa fuscidentalis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(4), 806–811.
- Liu, Y. H., Kuo, S. C., Lee, Y.T., Chang, I.C.Y., Yang, S.P., Chen, T.L., y Fung, C.P. (2012). Amino acid substitutions of quinolone resistance determining regions in GyrA and ParC associated with quinolone resistance in *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter*

- genomic species 13TU. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 45(2), 108–112.
- Liu, Y., Rao, Q., Tu, J., Zhang, J., Huang, M., Hu, B., Lin, Q., y Luo, T. (2018). *Acinetobacter piscicola* sp. nov., isolated from diseased farmed Murray cod (*Maccullochella peelii peelii*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(3), 905–910.
- Longo, F., Vuotto, C., y Donelli, G. (2014). Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. *New Microbiol*, 37(2), 119–127.
- López-Gigosos, R. M., Mariscal-López, E., Gutierrez-Bedmar, M., García-Rodríguez, A., y Mariscal, A. (2017). Evaluation of antimicrobial persistent activity of alcohol-based hand antiseptics against bacterial contamination. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 36(7), 1197–1203.
- López, M., Rueda, A., Florido, J. P., Blasco, L., Gato, E., Fernández-García, L., Martínez-Martínez, L., Fernández-Cuenca, F., Pachón, J., Cisneros, J.M., Garnacho-Montero, J., Vila, J., Rodríguez-Baño, J., Pascual, A., Bou, G., y Tomás, M. (2016). Genomic Evolution of Two *Acinetobacter baumannii* Clinical Strains from ST-2 Clones Isolated in 2000 and 2010 (ST-2_clon_2000 and ST-2_clon_2010). *Genome Announcements*, 4(5), e01182-16.
- Luke, N.R., Sauberman, S.L., Russo, T.A., Beanan, J.M., Olson, R., Loehfelm, T.W., Cox, A.D., St. Michael, F., Vinogradov, E.V., y Campagnari, A.A. (2010). Identification and characterization of a glycosyltransferase involved in *Acinetobacter baumannii* lipopolysaccharide core biosynthesis. *Infection and Immunity*, 78(5), 2017–2023.
- Luna, C.M., y Aruj, P.K. (2007). Nosocomial *Acinetobacter* pneumonia. *Respirology*, 12(6), 787–791.
- Lv, W., Zhang, X., Hou, M., Han, D., Li, Y., y Xiong, W. (2019). Draft genome sequence of an OXA-23, OXA-66, ADC-25 and TEM-1D co-producing *Acinetobacter baumannii* ST195 isolated from a patient with neonatal pneumonia in China. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 16, 1–3.
- Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D.L., Rice, L.B., Stelling, J., Struelens, M.J., Vatopoulos, A., Weber, J.T., y Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268–281.
- Magnet, S., Courvalin, P., y Lambert, T. (2001). Resistance-Nodulation-Cell Division-Type Eflux Pump Involved in Aminoglycoside Resistance in *Acinetobacter baumannii* Strain BM4454. *Society*, 45(12), 3375–3380.
- Mahzounieh, M., Khoshnood, S., Ebrahimi, A., Habibian, S., y Yaghoobian, M. (2014). Detection of antiseptic-resistance genes in *Pseudomonas* and *Acinetobacter* spp. isolated from burn patients. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 9(2), 1–4.
- Malhotra, J., Anand, S., Jindal, S., Rajagopal, R., y Lal, R. (2012). *Acinetobacter indicus* sp. nov., isolated from a hexachlorocyclohexane dump site. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(12), 288–2890.
- Manchanda, V., Sinha, S., y Singh, N. (2010). Multidrug resistant *Acinetobacter*. *Journal of Global Infectious Diseases*, 2(3), 291.
- Mancilla-Rojano, J., Castro-Jaimes, S., Ochoa, S. A., Bobadilla del Valle, M., Luna-Pineda, V. M., Bustos, P., Laris-González, A., Arellano-Galindo, J., Parra-Ortega, I., Hernández-Castro, R., Cevallos, M.A., Xicohtencatl-Cortes, J., y Cruz-Córdova, A. (2019). Whole-genome sequences of five *Acinetobacter baumannii* strains from a child with leukemia M2.

- Frontiers in Microbiology*, 10(132), 1–16.
- Martin, S.E., Flowers, R.S., y Ordal, Z.J. (1976). Catalase: Its Effect on Microbial Enumeration. *Applied and Environmental Microbiology*, 32(5), 731–734.
- Martró, E., Hernández, A., Ariza, J., Domínguez, M.A., Matas, L., Argerich, M.J., Martin, R., y Ausina, V. (2003). Assessment of *Acinetobacter baumannii* susceptibility to antiseptics and disinfectants. *Journal of Hospital Infection*, 55(1), 39–46.
- McArthur, A. G., Waglechner, N., Nizam, F., Yan, A., Azad, M. A., Baylay, A. J., Bhullar, K., Canova, M.J., De Pascale, G., Ejim, L., Kalan, L., King, A.M.; Koteva, K., Morar, M., Mulvey, M.R., O'Brien, J.S., Pawlowski, A.C., Piddock, L.J.V., Spanogiannopoulos, P., Sutherland, A.D., Tang, I., Taylor, P.L., Thaker, M., Wang, W., Yan, M., Yu, T., y Wright, G. D. (2013). The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(7), 3348–3357.
- McConnell, M. J., Actis, L., y Pachón, J. (2013). *Acinetobacter baumannii*: Human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(2), 130–155.
- McDonald, L.C., Banerjee, S.N., y Jarvis, W.R. (1999). Seasonal Variation of *Acinetobacter* Infections: 1987-1996. *Clinical Infectious Diseases*, 29(5), 1133–1137.
- Merino, M., Acosta, J., Poza, M., Sanz, F., Becceiro, A., Chaves, F., y Bou, G. (2010). OXA-24 carbapenemase gene flanked by XerC/XerD-like recombination sites in different plasmids from different *Acinetobacter* species isolated during a nosocomial outbreak. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(6), 2724–2727.
- Merod, R.T., y Wuertz, S. (2014). Extracellular polymeric substance architecture influences natural genetic transformation of *Acinetobacter baylyi* in biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(24), 7752–7757.
- Molina, J., Becceiro, A., Pachón, J., Pascual, Á., Fernández-Cuenca, F., Martínez-Martínez, L., Bou, G., Vila, J., Cisneros, J.M., Ribera, A., y Rodríguez-Baño, J. (2010). Clinical Features of Infections and Colonization by *Acinetobacter* Genospecies 3. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(12), 4623–4626.
- Moore, J. E., Huang, J., Yu, P., Ma, C., Moore, P. J., Millar, B. C., Goldsmith, C.E., y Xu, J. (2014). High diversity of bacterial pathogens and antibiotic resistance in salmonid fish farm pond water as determined by molecular identification employing 16S rDNA PCR, gene sequencing and total antibiotic susceptibility techniques. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 108, 281–286.
- Morgan, D.J., Liang, S.Y., Smith, C.L., Johnson, J.K., Harris, A.D., Furuno, J.P., Thom, K. A., Snyder, G.M., Day, H.R., y Perencevich, E.N. (2010). Frequent multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* contamination of gloves, gowns, and hands of healthcare workers. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 31(7), 716–721.
- Morgan, D.J., Rogawski, E., Thom, K.A., Johnson, K., Perencevich, E.N., Shardell, M., Leekha, S., y Harris, A.D. (2013). Transfer of multidrug-resistant bacteria to healthcare workers' gloves and gowns after patient contact increases with environmental contamination. *NIH Public Access*, 40(4), 1045–1051.
- Munoz-Price, L.S., Arheart, K. L., Mills, J.P., Cleary, T., Depascale, D., Jimenez, A., Fajardo-Aquino, Y., Coro, G., Birnbach, D., y J Lubarsky, D.A. (2012). Associations between bacterial contamination of health care workers' hands and contamination of white coats and scrubs. *American Journal of Infection Control*, 40(9), e245-8.
- Mussi, M.A., Limansky, A.S., y Viale, A.M. (2005). Acquisition of resistance to carbapenems in multidrug-resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii*: natural insertional

- inactivation of a gene encoding a member of a novel family of beta-barrel outer membrane proteins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(4), 1432–1440.
- Nait Chabane, Y., Marti, S., Rihouey, C., Alexandre, S., Hardouin, J., Lesouhaitier, O., Vila, J., Kaplan, J.B., Jouenne, T., y Dé, E. (2014). Characterisation of pellicles formed by *Acinetobacter baumannii* at the air-liquid interface. *PLoS One*, 9(10), e111660.
- Nemec, A., Baere, T.D., Tjernberg, I., Vaneechoutte, M., Reijden, T.J., y Dijkshoorn, L. (2001). *Acinetobacter schindleri* sp. nov., isolated from human clinical specimens within the genus *Acinetobacter*, designated phenon 1 and phenon 2, was new genomic species. Furthermore, 16S rRNA gene sequence analysis of three. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(2001), 1891–1899.
- Nemec, A., Dijkshoorn, L., Cleenwerck, I., De Baere, T., Janssens, D., van der Reijden, T.J.K., Ježek, P., y Vaneechoutte, M. (2003). *Acinetobacter parvus* sp. nov., a small-colony-forming species isolated from human clinical specimens. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(5), 1563–1567.
- Nemec, A., Krizova, L., Maixnerova, M., Sedo, O., Brisse, S., y Higgins, P.G. (2015). *Acinetobacter seifertii* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex isolated from human clinical specimens. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(3), 934–942.
- Nemec, A., Krizova, L., Maixnerova, M., van der Reijden, T.J.K., Deschaght, P., Passet, V., Vaneechoutte, M., Brisse, S., y Dijkshoorn, L. (2011). 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 specie 13TU). *Research in Microbiology*, 162(4), 393–404.
- Nemec, A., Musílek, M., Maixnerová, M., De Baere, T., van der Reijden, T.J.K., Vaneechoutte, M., y Dijkshoorn, L. (2009). *Acinetobacter beijerinckii* sp. nov. and *Acinetobacter gyllenbergii* sp. nov., haemolytic organisms isolated from humans. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(1), 118–124.
- Nemec, A., Musílek, M., Šedo, O., Baere, T. De, Maixnerová, M., Reijden, T.J.K., Zdráhal, Z., Vaneechoutte, M., y Dijkshoorn, L. (2010). *Acinetobacter berežiniae* sp. nov. and *Acinetobacter guillouiae* sp. nov., to accommodate *Acinetobacter* genomic species 10 and 11, respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(4), 896–903.
- Nemec, A., Radolfova-Krizova, L., Maixnerova, M., y Sedo, O. (2017). *Acinetobacter colistiniresistens* sp. nov. (formerly genomic species 13 sensu Bouvet and Jeanjean and genomic species 14 sensu Tjernberg and Ursing), isolated from human infections and characterized by intrinsic resistance to polymyxins. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(7), 2134–2141.
- Nemec, A., Radolfova-Krizova, L., Maixnerova, M., Vrestiakova, E., Jezek, P., y Sedo, O. (2016). Taxonomy of haemolytic and/or proteolytic strains of the genus *Acinetobacter* with the proposal of *Acinetobacter courvalinii* sp. Nov. (genomic species 14 sensu Bouvet and Jeanjean), *Acinetobacter dispersus* sp. nov. (genomic species 17), *Acinetobacter* modes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(4), 1673–1685.
- Nhu, N. T. K., Riordan, D. W., Nhu, T. D. H., Thanh, D. P., Thwaites, G., Lan, N.P.H., Wren, B.W., Baker, S., y Stabler, R. A. (2016). The induction and identification of novel Colistin resistance mutations in *Acinetobacter baumannii* and their implications. *Scientific Reports*, 6(28291), 1–8.
- Nishimura, Y., Ino, T., y Iizuka, H. (1988). *Acinetobacter radioresistens* sp. nov. Isolated from

- Cotton and Soil. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 38(2), 209–211.
- Nocker, A., Fernández, P. S., Montijn, R., y Schuren, F. (2012). Effect of air drying on bacterial viability: A multiparameter viability assessment. *Journal of Microbiological Methods*, 90(2), 86–95.
- Nowak, P., y Paluchowska, P. (2016). *Acinetobacter baumannii*: biology and drug resistance - role of carbapenemases. *Folia Histochemica et Cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society*, 54(2), 61–74.
- O'Toole, G.A., y Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol*, 30(2), 295–304.
- Oliver, J.D. (2010). Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(4), 415–425.
- Olson, J., Lord, C., y McCarthy, P. (2000). Improved Recoverability of Microbial Colonies from Marine Sponge Samples. *Microbial Ecology*, 40(2), 139–147.
- Oren, A., y Garrity, G.M. (2011). List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61, 1499–1501.
- Oren, A., y Garrity, G.M. (2014). List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 3603–3606.
- Oren, A., y Garrity, G.M. (2017). List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67, 3140–3143.
- Ostrer, L., Khodursky, R.F., Johnson, J.R., Hiasa, H., y Khodursky, A. (2019). Analysis of mutational patterns in quinolone resistance-determining regions of GyrA and ParC of clinical isolates. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 53(3), 318–324.
- Otter, J.A., Yezli, S., Salkeld, J.A.G., y French, G.L. (2013). Evidence that contaminated surfaces contribute to the transmission of hospital pathogens and an overview of strategies to address contaminated surfaces in hospital settings. *American Journal of Infection Control*, 41(5 SUPPL.), S6–S11.
- Overbeek, R., Olson, R., Pusch, G.D., Olsen, G.J., Davis, J.J., Disz, T., Edwards, R.A., Gerdes, S., Parrello, B., Shukla, M., Vonstein, V., Wattam, A.R., Xia, F., y Stevens, R. (2014). The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Research*, 42(D1), 206–214.
- Pagano, M., Martins, A.F., y Barth, A.L. (2016). Mobile genetic elements related to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(4), 785–792.
- Pailhoriès, H., Hadjadj, L., Mahieu, R., Crochette, N., Rolain, J.M., y Kempf, M. (2016). Fortuitous diagnosis of NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* carriage in a patient from France with no recent history of travel. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(3), 942–944.
- Park, K.H., Shin, J.H., Lee, S.Y., Kim, S.H., Jang, M. O., Kang, S. J., Jung, S.I., Chung, E.K., Ko, K.S., y Jang, H. C. (2013). The Clinical Characteristics, Carbapenem Resistance, and Outcome of *Acinetobacter* Bacteremia According to Genospecies. *PLoS ONE*, 8(6), 4–8.
- Partridge, S.R., Kwong, S.M., Firth, N., y Jensen, S.O. (2018). Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(4), 1–61.

- Peleg, A.Y., de Breij, A., Adams, M.D., Cerqueira, G.M., Mocali, S., Galardini, M., Nibbering, P.H., Earl, A.M., Ward, D.V., Paterson, D.L., Seifert, H., y Dijkshoorn, L. (2012). The Success of *Acinetobacter* Species; Genetic, Metabolic and Virulence Attributes. *PLoS ONE*, 7(10).
- Peleg, A.Y., Jara, S., Monga, D., Eliopoulos, G.M., Moellering, R.C., y Mylonakis, E. (2009). *Galleria mellonella* as a Model System To Study *Acinetobacter baumannii* Pathogenesis and Therapeutics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(6), 2605–2609.
- Peleg, A.Y., Seifert, H., y Paterson, D.L. (2008). *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(3), 538–582.
- Perez, F., Ponce-Terashima, R., Adams, M.D., y Bonomo, R.A. (2011). Are we closing in on an “elusive enemy”? The current status of our battle with *Acinetobacter baumannii*. *Virulence*, 2(2), 86–90.
- Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G., y Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, 8(10), 785–786.
- Piao, C., Li, Y., He, W., Wang, H.M., Xie, S., Chang, J., y Guo, L. (2015). Description of *Acinetobacter populi* sp. nov. isolated from symptomatic bark of *Populus × euramericana* canker. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(12), 4461–4468.
- Piddock, L.J.V. (2006a). Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 43(2), 382–402.
- Piddock, L.J.V. (2006b). Multidrug - resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 4, 629–636.
- Poole, K. (2004). Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology and Infection*, 10(1), 12–26.
- Poole, K. (2005). Efflux-mediated antimicrobial resistance. *Antibiotic Discovery and Development*, 5(1), 20–51.
- Poppel, M. T., Skiebe, E., Laue, M., Bergmann, H., Ebersberger, I., Garn, T., Fruth, A., Baumgardt, S., Busse, H.J., y Wilharm, G. (2016). *Acinetobacter equi* sp. nov., isolated from horse faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(2), 881–888.
- Prescott, L. M., Harley, J. P., y Klein, D. A. (1999). Crecimiento microbiano. In *Microbiología* (Cuarta Ed., pp. 114–136). Aravaca (Madrid): McGraw-Hill - Interamericana.
- Qi, L., Li, H., Zhang, C., Liang, B., Li, J., Wang, L., Du, X., Liu, X., Qiu, S., y Song, H. (2016). Relationship between antibiotic resistance, biofilm formation, and biofilm-specific resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Frontiers in Microbiology*, 7(483), 1–10.
- Quail, M.A., Smith, M., Coupland, P., Otto, T.D., Harris, S.R., Connor, T.R., Bertoni, A., Swerdlow, H.P., y Gu, Y. (2012). A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics*, 13, 341.
- Radolfova-Krizova, L., Maixnerova, M., y Nemeč, A. (2016a). *Acinetobacter celticus* sp. nov., a psychrotolerant species widespread in natural soil and water ecosystems. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(12), 5392–5398.
- Radolfova-Krizova, L., Maixnerova, M., y Nemeč, A. (2016b). *Acinetobacter pragensis* sp. nov., found in soil and water ecosystems. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(10), 3897–3903.

- Rajamohan, G., Srinivasan, V.B., y Gebreyes, W.A. (2010). Molecular and functional characterization of a novel efflux pump, AmvA, mediating antimicrobial and disinfectant resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(9), 1919–1925.
- Ramos, J.L., Gallegos, M.T., Marqués, S., Ramos-González, M.I., Espinosa-Urgel, M., y Segura, A. (2001). Responses of gram-negative bacteria to certain environmental stressors. *Current Opinion in Microbiology*, 4(2), 166–171.
- Remuzgo-Martínez, S., Lázaro-Díez, M., Mayer, C., Aranzamendi-Zaldumbide, M., Padilla, D., Calvo, J., Marco, F., Martínez-Martínez, L., Icardo, J.M., Otero, A., y Ramos-Vivas, J. (2015). Biofilm Formation and Quorum-Sensing-Molecule Production by Clinical Isolates of *Serratia liquefaciens*. *American Society for Microbiology*, 81(10), 3306–3315.
- Richardson, E.J., y Watson, M. (2012). The automatic annotation of bacterial genomes. *Briefings in Bioinformatics*, 14(1), 1–12.
- Robinson, A., Brzoska, A.J., Turner, K.M., Withers, R., Harry, E.J., Lewis, P.J., y Dixon, N. E. (2010). Essential Biological Processes of an Emerging Pathogen: DNA Replication, Transcription, and Cell Division in *Acinetobacter* spp. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(2), 273–297.
- Roca, I., Espinal, P., Vila-Fanés, X., y Vila, J. (2012). The *Acinetobacter baumannii* oxymoron: Commensal hospital dweller turned pan-drug-resistant menace. *Frontiers in Microbiology*, 3(148), 1–30.
- Rodríguez-Baño, J., Martí, S., Soto, S., Fernández-Cuenca, F., Cisneros, J.M., Pachón, J., Pascual, A., Martínez-Martínez, L., Mcqueary, C., Actis, L.A., y Vila, J. (2008). Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: Associated features and clinical implications. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(3), 276–278.
- Rooney, A.P., Dunlap, C.A., y Flor-Weiler, L.B. (2016). *Acinetobacter lactuca* sp. nov., isolated from iceberg lettuce (Asteraceae: *Lactuca sativa*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(9), 3566–3572.
- Rumbo, C., Fernández-Moreira, E., Merino, M., Poza, M., Mendez, J.A., Soares, N.C., Mosquera, A., Chaves, F., y Bou, G. (2011). Horizontal transfer of the OXA-24 carbapenemase gene via outer membrane vesicles: A new mechanism of dissemination of carbapenem resistance genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(7), 3084–3090.
- Runci, F., Bonchi, C., Frangipani, E., Visaggio, D., y Visca, P. (2017). *Acinetobacter baumannii* Biofilm Formation in Human Serum and Disruption by Gallium. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(1), 1–8.
- Russo, T. A., Luke, N. R., Beanan, J. M., Olson, R., Sauberan, S. L., MacDonald, U., Schultz, L.W., Umland, T.C., y Campagnari, A.A. (2010). The K1 capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* strain 307-0294 is a major virulence factor. *Infection and Immunity*, 78(9), 3993–4000.
- Russo, T. A., MacDonald, U., Beanan, J. M., Olson, R., MacDonald, I. J., Sauberan, S. L., Luke, N.R., Schultz, L.W., y Umland, T.C. (2009). Penicillin-Binding Protein 7/8 Contributes to the Survival of *Acinetobacter baumannii* In Vitro and In Vivo. *The Journal of Infectious Diseases*, 199(4), 513–521.
- Sahl, J.W., Gillece, J.D., Schupp, J.M., Waddell, V.G., Driebe, E.M., Engelthaler, D.M., y Keim, P. (2013). Evolution of a pathogen: a comparative genomics analysis identifies a genetic pathway to pathogenesis in *Acinetobacter*. *PLoS ONE*, 8(1), 1–10.

- Sahl, J.W., Johnson, J.K., Harris, A.D., Phillippy, A.M., Hsiao, W.W., Thom, K.A., y Rasko, D.A. (2011). Genomic comparison of multi-drug resistant invasive and colonizing *Acinetobacter baumannii* isolated from diverse human body sites reveals genomic plasticity. *BMC Genomics*, 12.
- San Millan, A., y MacLean, R.C. (2017). Fitness Costs of Plasmids: a Limit to Plasmid Transmission. *Microbiology Spectrum*, 5(5), 1–12.
- Sanchez-Larrayoz, A.F., Elhosseiny, N. M., Chevrette, M. G., Fu, Y., Giunta, P., Spallanzani, R.G., Ravi, K., Pier, G.B., Lory, S., y Maira-Litrán, T. (2017). Complexity of Complement Resistance Factors Expressed by *Acinetobacter baumannii* Needed for Survival in Human Serum. *The Journal of Immunology*, 199(8), 2803–2814.
- Sanger, F., y Coulson, A. R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*, 94(3), 441–448.
- Sanger, F., Nicklen, S., y Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463–5467.
- Schachter, B. (2003). Slimy business - The biotechnology of biofilms. *Nature Biotechnology*, 21(4), 361–365.
- Seemann, T. (2014). Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14), 2068–2069.
- Seifert, H., Dijkshoorn, L., Gerner-Smidt, P., Pelzer, N., Tjernberg, I., y Vanechoutte, M. (1997). Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: Comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(11), 2819–2825.
- SEIMC. (2015). Métodos microbiológicos para la vigilancia del estado de portador de bacterias multirresistentes. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. *Procedimientos en Microbiología Clínica*.
- Shamsizadeh, Z., Nikaeen, M., Esfahani, B.N., Mirhoseini, S.H., Hatamzadeh, M., y Hassanzadeh, A. (2017). Detection of antibiotic resistant *Acinetobacter baumannii* in various hospital environments: Potential sources for transmission of acinetobacter infections. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 22(1), 1–7.
- Siguié, P., Perochon, J., Lestrade, L., Mahillon, J., y Chandler, M. (2006). ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Research*, 34, D32–D6.
- Sirijan, S., y Nitaya, I. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria in ESKAPE pathogens. *Control*, 2016.
- Smet, A., Cools, P., Krizova, L., Maixnerova, M., Sedo, O., Haesebrouck, F., Kempf, M., Nemeč, A., y Vanechoutte, M. (2014). *Acinetobacter gandensis* sp. nov. isolated from horse and cattle. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(2014), 4007–4015.
- Snipen, L., Almoy, T., y Ussery, D.W. (2009). Microbial comparative pan-genomics using binomial mixture models. *BMC Genomics*, 10, 385.
- Snitkin, E.S., Zelazny, A.M., Montero, C.I., Stock, F., Mijares, L., Murray, P.R., Segre, J.A., Mullikin, J., Blakesley, R., Young, A., y Thomas, P. (2011). Genome-wide recombination drives diversification of epidemic strains of *Acinetobacter baumannii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(33), 13758–13763.
- Steimle, A., Autenrieth, I.B., y Frick, J.S. (2016). Structure and function: Lipid A modifications in commensals and pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*, 306(5), 290–301.

- Stevenson, C., Hall, J.P.J., Brockhurst, M.A., y Harrison, E. (2018). Plasmid stability is enhanced by higher-frequency pulses of positive selection. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285(1870), 20172497.
- Stewart, F.M., y Levin, B.R. (1977). The Population Biology of Bacterial Plasmids: a priori Conditions for the Existence of Conjugationally Transmitted Factors. *Genetics*, 87(2), 209–228.
- Subashchandrabose, S., Smith, S., DeOrnellas, V., Crepin, S., Kole, M., Zahdeh, C., y Mobley, H.L.T. (2016). *Acinetobacter baumannii* Genes Required for Bacterial Survival during Bloodstream Infection. *MSphere*, 1(1), e00013-15.
- Sun, D., Crowell, S.A., Harding, C.M., De Silva, P. M., Harrison, A., Fernando, D. M., Mason, K.M., Santana, E., Loewen, P.C., Kumar, A., y Liu, Y. (2016). KatG and KatE confer *Acinetobacter* resistance to hydrogen peroxide but sensitize bacteria to killing by phagocytic respiratory burst. *Life Sciences*, 148, 31–40.
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outterson, K., Patel, J., Cavaleri, M., Cox, E.M., Houchens, C.R., Grayson, M.L., Hansen, P., Singh, N., Theuretzbacher, U., Magrini, N., y WHO Pathogens Priority List Working Group (2017). Discovery, research, and development of new antibiotics: The WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 3099(17), 1–10.
- Tipton, K.A., Chin, C., Farokhyfar, M., Weiss, D.S., y Rather, P.N. (2018). Role of Capsule in Resistance to Disinfectants, Host Antimicrobials, and Desiccation in *Acinetobacter baumannii* Kyle, 1–6.
- Tjernberg, I., y Ursing, J. (1989). Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridation. *APMIS*, 97(24), 595–605.
- Tomaras, A.P., Dorsey, C.W., Edelmann, R.E., y Actis, L.A. (2003). Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: Involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology*, 149(12), 3473–3484.
- Toro, M., Garcillán-Barcia, M.P., y de la Cruz, F. (2014). Plasmid Diversity and Adaptation Analyzed by Massive Sequencing of *Escherichia coli* Plasmids. *Microbiology Spectrum*, 2(6), 1–16.
- Touchon, M., Cury, J., Yoon, E.J., Krizova, L., Cerqueira, G. C., Murphy, C., Feldgarden, M., Wortman, J., Clermont, D., Lambert, T., Grillot-Courvalin, C., Nemeč, A., Courvalin, P., y Rocha, E.P.C. (2014). The Genomic Diversification of the Whole *Acinetobacter* Genus: Origins, Mechanisms, and Consequences. *Genome Biology and Evolution*, 6(10), 2866–2882.
- Towner, K. J. (2009). *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. *Journal of Hospital Infection*, 73(4), 355–363.
- Tsai, C.J.Y., San Loh, J.M., y Proft, T. (2016). *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence*, 0(0), 1–16.
- Turton, J. F., Shah, J., Ozongwu, C., y Pike, R. (2010b). Incidence of *Acinetobacter* species other than *A. baumannii* among clinical isolates of *Acinetobacter*: Evidence for emerging species. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(4), 1445–1449.
- Turton, J.F., Woodford, N., Glover, J., Yarde, S., Kaufmann, M.E., y Pitt, T.L. (2006). Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the bla OXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(8), 2974–2976.

- Valencia, R., Arroyo, L.A., Conde, M., Aldana, J.M., Torres, M.J., Fernández-Cuenca, F., Garnacho-Montero, J., Cisneros, J.M., Ortiz, C., Pachón, J., y Aznar, J. (2009). Nosocomial Outbreak of Infection With Pan-Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii* in a Tertiary Care University Hospital. *Infection Control y Hospital Epidemiology*, 30(03), 257–263.
- Vallenet, D., Nordmann, P., Barbe, V., Poirel, L., Mangenot, S., Bataille, E., Dossat, C., Gas, S., Kreimeyer, A., Lenoble, P., Oztas, S., Poulain, J., Segurens, B., Robert, C., Abergel, C., Claverie, J.M., Raoult, D., Médigue, C., Weissenbach, J., y Cruveiller, S. (2008). Comparative analysis of acinetobacters: Three genomes for three lifestyles. *PLoS ONE*, 3(3).
- van den Broek, P. J., van der Reijden, T.J.K., van Strijen, E., Helmig-Schurter, A.V, Bernards, A.T., y Dijkshoorn, L. (2009). Endemic and epidemic *Acinetobacter* species in a university hospital: an 8-year survey. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(11), 3593–3599.
- Van Looveren, M., Goossens, H., Baquero, F., Bruce, J., Cookson, B., Cornaglia, G., Dijkshoorn, L., Gould, I., Kahlmeter, G., Krcmery, V., Monnet, D., MacKenzie, F., Mollison, J., Struelens, M., Towner, K., van den Broek, P.J., van der Meer, J., Vila, J.
- Voss, A. Wagner, D. (2004). Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp. in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 10(8), 684–704.
- Vanechoutte, M., Nemec, A., Musilek, M., van der Reijden, T. J. K., van den Barselaar, M., Tjernberg, I., Calame, W., Fani, R., De Baere, T., y Dijkshoorn, L. (2009). Description of *Acinetobacter venetianus* ex Di Cello *et al.* 1997 sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(6), 1376–1381.
- Vaz-Moreira, I., Novo, A., Hantsis-Zacharov, E., Lopes, A.R., Gomila, M., Nunes, O.C., Manaia, C.M., y Halpern, M. (2011). *Acinetobacter rudis* sp. nov., isolated from raw milk and raw wastewater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(12), 2837–2843.
- Vidal, R., Domínguez, M., Urrutia, H., Bello, H., González, G., García, A., y Zemelman, R. (1996). Biofilm formation by *Acinetobacter baumannii*. *Microbios*, 86(346), 49–58.
- Vijayakumar, S., Rajenderan, S., Laishram, S., Anandan, S., Balaji, V., y Biswas, I. (2016). Biofilm Formation and Motility Depend on the Nature of the *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates. *Frontiers in Public Health*, 4(May), 105.
- Vila, J., Ruiz, J., Goni, P., y Jiménez-de Anta, T. (1997). Quinolone-resistance mutations in the topoisomerase IV parC gene of *Acinetobacter baumannii*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 39(6), 757–762.
- Vila, J., Ruiz, J., Goni, P., Marcos, A., Jiménez-de Anta, T. (1995). Mutation in the gyrA gene of quinolone-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(5), 1201–1203.
- Wand, M.E., Bock, L.J., Turton, J.F., Nugent, P.G., y Mark Sutton, J. (2012). *Acinetobacter baumannii* virulence is enhanced in *Galleria mellonella* following biofilm adaptation. *Journal of Medical Microbiology*, 61(4), 470–477.
- Weber, B.S., Ly, P.M., Irwin, J.N., Pukatzki, S., y Feldman, M.F. (2015). A multidrug resistance plasmid contains the molecular switch for type VI secretion in *Acinetobacter baumannii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(30), 9442–9447.
- Weber, D.J., Anderson, D., y Rutala, W.A. (2013). The role of the surface environment in healthcare-associated infections. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 26(4), 338–344.
- Wendt, C., Dietze, B., Dietz, E., y Den, H.R. (1997). Survival of *Acinetobacter baumannii* on

- Dry Surfaces. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(6), 1394–1397.
- WHO. (2014). Hospital Hygiene and Infection Control. *Safe management of wastes from health-care activities* (pp. 148–158).
- WHO, (2017). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics.
- Wick, R.R., Judd, L.M., Gorrie, C.L., y Holt, K.E. (2017). Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Computational Biology*, 13(6), 1–22.
- Wilharm, G., Piesker, J., Laue, M., y Skiebe, E. (2013). DNA Uptake by the nosocomial pathogen *Acinetobacter baumannii* occurs during movement along wet surfaces. *Journal of Bacteriology*, 195(18), 4146–4153.
- Wilharm, G., Skiebe, E., Higgins, P. G., Poppel, M. T., Blaschke, U., Leser, S., Heider, C., Heindorf, M., Brauner, P., Jackel, U., Bohland, K., Cuny, C., Lopinska, A., Kaminski, P., Kasprzak, M., Bochenski, M., Ciebiera, O., Tobolka, M., Zolnierowicz, K.M., Siekiera, J., Seifert, H., Gagne, S., Salcedo, S.P., Kaatz, M., Layer, F., Bender, J.K., Fuchs, S., Semmler, T., Pfeifer, Y., y Jerzak, L. (2017). Relatedness of wildlife and livestock avian isolates of the nosocomial pathogen *Acinetobacter baumannii* to lineages spread in hospitals worldwide. *Environmental Microbiology*, 19(10), 4349–4364.
- Wisplinghoff, H., Paulus, T., Lugenheim, M., Stefanik, D., Higgins, P.G., Edmond, M.B., Wenzel, R.P., y Seifert, H. (2012). Nosocomial bloodstream infections due to *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter pittii* and *Acinetobacter nosocomialis* in the United States. *Journal of Infection*, 64(3), 282–290.
- Wisplinghoff, H., Schmitt, R., Wöhrmann, A., Stefanik, D., y Seifert, H. (2007). Resistance to disinfectants in epidemiologically defined clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Hospital Infection*, 66(2), 174–181.
- Wong, D., Nielsen, T.B., Bonomo, R.A., Pantapalangkoor, P., Luna, B., y Spellberg, B. (2017). Clinical and Pathophysiological Overview of *Acinetobacter* Infections: a Century of Challenges. *Clinical Microbiology Reviews*, 30(1), 409–447.
- Wright, M.S., Haft, D.H., Harkins, D.M., Perez, F., Hujer, K.M., Bajaksouzian, S., Benard, M.F., Jacobs, M.R., Bonomo, R.A., y Adams, M. D. (2014). New insights into dissemination and variation of the health care-associated pathogen *Acinetobacter baumannii* from genomic analysis. *MBio*, 5(1), e00963-13.
- Wright, M.S., Mountain, S., Beerli, K., y Adams, M.D. (2017). Assessment of Insertion Sequence Mobilization as an Adaptive Response to Oxidative Stress in *Acinetobacter baumannii* Using IS-seq. *Journal of Bacteriology*, 199(9), 1–9.
- Yoon, J.H., Kim, I.G., y Oh, T.K. (2007). *Acinetobacter marinus* sp. nov. and *Acinetobacter seohaensis* sp. nov., isolated from sea water of the Yellow Sea in Korea. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(11), 1743–1750.
- Zhang, H., Zhang, J., y Qiao, L. (2013). The *Acinetobacter baumannii* group: a systemic review. *World Journal of Emergency Medicine*, 4(3), 169–174.
- Zhao, Y., Jia, X., Yang, J., Ling, Y., Zhang, Z., Yu, J., Wu, J., y Xiao, J. (2014). PanGP: A tool for quickly analyzing bacterial pan-genome profile. *Bioinformatics*, 30(9), 1297–1299.

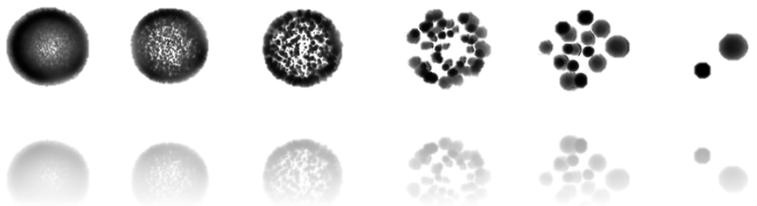
<http://www.bacterio.net/acinetobacter.html>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy/>

LINKS PROGRAMAS

- **RAST:** <http://rast.nmpdr.org/>
- **CARD:** <http://arpcard.mcmaster.ca/>
- **EggNOG:** http://eggnogdb.embl.de/download/eggnog_4.5/
- **ANI:** <http://ggdc.dsmz.de/ggdc.php/>
- **DDH:** <http://ggdc.dsmz.de/ggdc.php/>
- **ISFinder:** <https://www-is.biotoul.fr/blast.php/>
- **PLACNET:** <https://castillo.dicom.unican.es/upload/>
- **Python:** <https://conda-forge.github.io/>

PUBLICACIONES





Whole-Genome Sequence of *Acinetobacter pittii* HUMV-6483 Isolated from Human Urine

Itziar Chapartegui-González,^{a,b} María Lázaro-Díez,^{a,b,c} Santiago Redondo-Salvo,^d Laura Alted-Pérez,^e Javier Gonzalo Ocejo-Vinyals,^f Jesús Navas,^{c,g} José Ramos-Vivas^{a,b,c}

Instituto de Investigación Valdecilla IDIVAL, Santander, Spain^a; Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, Spain^b; Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain^c; Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBTec), Universidad de Cantabria, Santander, Spain^d; Departamento de Protección Ambiental, Estación Experimental del Zaidín (CSIC) Granada, Spain^e; Servicio de Inmunología Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, Spain^f; Departamento de Biología Molecular, Universidad de Cantabria, Santander, Spain^g

ABSTRACT *Acinetobacter pittii* strain HUMV-6483 was obtained from urine from an adult patient. We report here its complete genome assembly using PacBio single-molecule real-time sequencing, which resulted in a chromosome with 4.07 Mb and a circular contig of 112 kb. About 3,953 protein-coding genes are predicted from this assembly.

Acinetobacter species are inherently resistant to several antibiotics or are capable of readily acquiring resistance. Also, clinical isolates are able to rapidly spread among patients and survive in the hospital environment (1). *Acinetobacter baumannii* has been extensively studied because it has been associated with a high mortality rate. However, *Acinetobacter pittii* is increasingly identified as a causative agent of nosocomial infections (2, 3). Moreover, the emergence of carbapenem-resistant *A. pittii* strains possessing carbapenem-hydrolyzing β -lactamases, such as NDM-1, has become a great medical concern (4). The strain used in this study (HUMV-6483) was isolated from urine from a man at the Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV) in Santander, Spain. The strain was routinely cultured in Luria-Bertani (LB) agar or broth at 37°C and frozen at -80°C with 20% glycerol.

A total genomic sample of *A. pittii* strain HUMV-6483 was extracted and purified using the GeneJET genomic DNA isolation kit (Thermo Scientific). The genomic DNA was submitted to Macrogen (South Korea) for PacBio single-molecule real-time (SMRT) sequencing. A single library was prepared for *A. pittii* HUMV-6483 and run on one SMRT cell. With a genome size of approximately 4.07 Mb, PacBio SMRT sequencing provided approximately 100% coverage of the entire *A. pittii* HUMV-6483 genome. SMRT sequencing initially resulted in 223,406 raw reads, with a mean subread length of 6,275 bp (N_{50} , 7,971 bp), totaling 1,401,914,243 nucleotides. The generated reads were then introduced into the Hierarchical Genome Assembly Process version 3 (HGAP3), which includes assembly with the Celera Assembler and assembly polishing with Quiver (5). The final complete genome resulted in a circular chromosome of 4,070,270 bp with a total G+C content of 39% and a circular contig of 112,604 bp with a total G+C content of 38.5%. A total of 3,953 protein-coding sequences were predicted, of which 74 encode tRNA and 18 encode rRNA. The RAST server (6) predicted coding sequences belonging to 456 subsystems, including 321 involved in carbohydrate catabolism, 303 involved in protein metabolism, 427 involved in the synthesis of amino acids and derivatives, 124 involved in cell wall and capsule synthesis, 133 involved in RNA metabolism, and 91 involved in DNA metabolism, including 260 in cofactors, vitamins,

Received 24 May 2017 Accepted 31 May 2017 Published 20 July 2017

Citation Chapartegui-González I, Lázaro-Díez M, Redondo-Salvo S, Alted-Pérez L, Ocejo-Vinyals JG, Navas J, Ramos-Vivas J. 2017. Whole-genome sequence of *Acinetobacter pittii* HUMV-6483 isolated from human urine. *Genome Announc* 5:e00658-17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00658-17>.

Copyright © 2017 Chapartegui-González et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to José Ramos-Vivas, jvivas@idival.org.

prosthetic groups, or pigments, 99 in nucleoside and nucleotide synthesis, 158 in fatty acid and lipid synthesis, 101 in virulence, 113 in membrane transport, 37 in phosphorus metabolism, 82 in regulation and cell signaling, 5 in secondary metabolism, 37 in phages, prophages, transposable elements, and plasmids, 127 in stress response, and 2 in dormancy and sporulation.

Accession number(s). The complete genome sequence of *A. pittii* strain HUMV-6483 has been deposited at DDBJ/EMBL/GenBank under the accession numbers [CP021428](#) (chromosome) and [CP021429](#) (plasmid).

ACKNOWLEDGMENTS

M.L.-D. holds a contract from the Instituto de Investigación Sanitaria Valdecilla IDIVAL and Universidad de Cantabria (PREVAL16/05). J.R.-V. was supported by the Spanish Instituto de Salud Carlos III, Spain (grant PI16/01103). Research in our laboratory is supported by Plan Nacional de I + D+I 2008–2011 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), cofinanced by the European Development Regional Fund (ERDF) “A way to achieve Europe.”

REFERENCES

1. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. 2007. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol* 5:939–951. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1789>.
2. Turton JF, Shah J, Ozongwu C, Pike R. 2010. Incidence of *Acinetobacter* species other than *A. baumannii* among clinical isolates of *Acinetobacter*: evidence for emerging species. *J Clin Microbiol* 48:1445–1449. <https://doi.org/10.1128/JCM.02467-09>.
3. Wisplinghoff H, Paulus T, Lugenheim M, Stefanik D, Higgins PG, Edmond MB, Wenzel RP, Seifert H. 2012. Nosocomial bloodstream infections due to *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter pittii* and *Acinetobacter nosocomialis* in the United States. *J Infect* 64:282–290. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2011.12.008>.
4. Pailhoriès H, Hadjadj L, Mahieu R, Crochette N, Rolain JM, Kempf M. 2016. Fortuitous diagnosis of NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* carriage in a patient from France with no recent history of travel. *J Antimicrob Chemother* 72:942–944. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw505>.
5. Chin CS, Alexander DH, Marks P, Klammer AA, Drake J, Heiner C, Clum A, Copeland A, Huddleston J, Eichler EE, Turner SW, Korlach J. 2013. Nonhybrid, finished microbial genome assemblies from long-read SMRT sequencing data. *Nat Methods* 10:563–569. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2474>.
6. Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma 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. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>.



Acinetobacter pittii biofilm formation on inanimate surfaces after long-term desiccation

Z. Bravo^{a,b,1}, I. Chapartegui-González^{a,c,1}, M. Lázaro-Díez^{a,c,d},
J. Ramos-Vivas^{a,c,d,*}

^a Instituto de Investigación Valdecilla IDIVAL, Santander, Spain

^b Department of Immunology, Microbiology and Parasitology, Faculty of Science and Technology, University of the Basque Country, Leioa, Spain

^c Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, Spain

^d Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 April 2017

Accepted 25 July 2017

Available online 29 July 2017

Keywords:

Acinetobacter pittii

Survival time

Biofilm

Healthcare-associated infection



SUMMARY

Background: The survival of pathogenic micro-organisms in the healthcare environment has a major role in nosocomial infections. Among the responsible mechanisms enabling nosocomial pathogens to persist with these stress conditions is their ability to resist desiccation and to form biofilms.

Aim: To investigate the survival behaviour of *Acinetobacter pittii* isolates on inert surfaces and saline microcosms.

Methods: Five *A. pittii* clinical strains were spotted over white laboratory coat fragments, glass, and plastic surfaces, or inoculated into sterile saline and monitored at room temperature for a period of 43 days.

Findings: Although the permanence on solid surfaces negatively affected the culturability of the strains used, a fraction of stressed cells survived for at least the period of study. On average, *A. pittii* culturability was reduced by 77.3%, 80.9%, and 68.1% in white coat, plastic, and glass surfaces, respectively. However, ~85.6% of the populations retain their culturability in saline solution. Culturability correlated with the presence of cells with an intact membrane, as demonstrated after live/dead staining. Supplementation of the culture medium with sodium pyruvate favoured the culturability of strains from all conditions; but, in general, *A. pittii* populations did not enter a viable but non-culturable state.

Conclusion: After long-term desiccation, all *A. pittii* strains retained, or even increased, their ability to form biofilms after they had been fed with nutrient media. This suggests that *A. pittii* may recover easily from desiccation and may express adherence factors to infect new hosts after rehydration.

© 2017 The Healthcare Infection Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author. Address: Hospital Marqués de Valdecilla IDIVAL, Microbiology, Avda Cardenal Herrera Oria s/n, Santander, 39011, Spain. Tel.: +34 942 315515x73172; fax: +34 942 315517.

E-mail address: jvivas@idival.org (J. Ramos-Vivas).

¹ Both authors contributed equally to this work.

Introduction

The genus *Acinetobacter* currently comprises 49 validly named species. Some species are closely related, including the members of the so-called *Acinetobacter*

calcoaceticus–*Acinetobacter baumannii* (Acb) complex. Bacteria within the Acb complex cause various types of human infection, including pneumonia, bacteraemia, wound infection, meningitis, and urinary tract infection [1]. The treatment options have become extremely limited due to the propensity of these species to develop resistance to conventional antimicrobial agents. *A. baumannii* is the most frequently recorded *Acinetobacter* spp. among clinical *Acinetobacter* isolates, and most hospital outbreaks are attributed to this species. Less frequently, *A. baumannii* also causes community-acquired infections, including pneumonia and bacteraemia [2].

Although *A. pittii* is considered less problematic than *A. baumannii*, this species is increasingly reported in clinical specimens [1,3]. Moreover, the emergence of carbapenem-resistant *A. pittii* strains possessing carbapenem-hydrolysing β -lactamases, such as NDM1, has become a great medical concern [4,5]. Knowledge of *Acinetobacter* virulence factors or their role in pathogenesis is limited. To the best of our knowledge, there are no detailed published reports on virulence factors in *A. pittii* [6,7]. Furthermore, *Acinetobacter* spp. may rapidly spread among patients in hospital settings. One important factor contributing to the spread of *Acinetobacter* in these environments is its propensity to withstand desiccation and to survive on inanimate surfaces [8,9]. Inert surfaces in hospitals (e.g. walls, furniture and equipment/medical devices) have often been described as the source for outbreaks of nosocomial infections, and contaminated objects include hospital bed rails and bed linen, curtains, mattresses, patients' gowns and clothing, tables, towels, etc. [10]. In this way, a single hand contact with a contaminated surface results in a variable degree of pathogen transfer [11].

A better understanding of *Acinetobacter* spp. survival in the hospital environment could provide key information to understand their epidemiology and to control their spread. It is thus of interest to investigate the responses of *Acinetobacter* spp. to conditions similar to those found in the hospital environment. Bacteria can attach to inert surfaces and survive desiccation; thus we believe that it is important to know what happens when stressed bacteria colonize or infect a new host, again resulting in a shift towards a nutrient-rich and warm environment. There is a knowledge gap concerning the bacterial transition from a stressed state (i.e. *ex vivo*, on inanimate surfaces) to a new environment with available nutrients and higher temperature (inside a new host). Those bacteria under stress should conserve factors that favour infection. In the present study, the behaviour of cells from *A. pittii* clinical isolates under starvation and desiccation conditions was evaluated. Furthermore, the maintenance of biofilm-forming capability of bacteria was examined after addition of nutrients to bacteria under desiccation stress.

Methods

Bacterial strains and inoculum preparation

Five *A. pittii* clinical isolates used in this work are listed in Table I, and have been described previously [7]. Reference strain *A. pittii* LMG 10559 was also included. The strains were routinely cultured on Luria Bertani (LB) broth or agar at 37°C, and frozen at –80°C with 20% glycerol. Strains were grown at 37°C with shaking (200 rpm) for 24 h. Cells were collected by

Table I
Acinetobacter pittii strains used in this study

| No. | Strain | Clinical source |
|-----|------------------------|-----------------------|
| 1 | LMG 10559 ^a | Tracheal aspirate |
| 2 | HUMV 0315 ^b | Sputum |
| 3 | HUMV 4336 | Diabetic foot exudate |
| 4 | HUMV 6207 | Wound exudate |
| 5 | HUMV 5918 | Wound exudate |
| 6 | HUMV 6483 | Urine |

^a LMG, Culture Collection at Laboratorium voor Microbiologie Gent.

^b HUMV, Culture Collection at Hospital Universitario Marqués de Valdecilla.

centrifugation (2500 g for 20 min) and washed three times with sterile saline solution (0.9 % wt/vol NaCl). Finally, cell pellets were suspended in sterile saline solution.

Survival assays

Acinetobacter pittii cells from stationary phase were incubated at $21.8 \pm 0.23^\circ\text{C}$ in liquid or solid environments. Starvation was implemented by incubating cells in sterile saline solution or on to cotton white laboratory coat fragments ($\sim 1\text{ cm}^2$), plastic (bottom of wells in 24-well plates (1.9 cm^2), Corning™ Costar™, Fisher Scientific, Madrid, Spain), or sterile glass coverslips (12 mm diameter, 1.13 cm^2). For survival assays in the aqueous environment, experiments were carried out in 50 mL polypropylene tubes (Fisher Scientific) containing 15 mL of sterile saline solution reaching a bacterial density of $\sim 10^7$ cells/mL.

For survival assays on to solid surfaces, glass coverslips, plastic or white laboratory coat fragments were inoculated with 50 μL spots of *A. pittii* at the same cell density. Coverslips and laboratory coat fragments were sterilized by autoclaving ($121^\circ\text{C}/20\text{ min}$) and 24-well plates were purchased from Fisher Scientific (individually wrapped, sterilized by gamma irradiation).

Coverslips and fragments of laboratory coats were placed in wells of several 24-well plates in the dark. Ambient humidity and temperature were measured with a hygrometer/thermometer (Thermo Hygro) and maintained at a relatively low level ($54 \pm 1.6\%$ humidity) and room temperature $21.8 \pm 0.23^\circ\text{C}$. To recover populations from solid surfaces, 1 mL of saline solution was added to glass or plastic surfaces and the cells were scraped off from the bottom using a 1 mL tip. To recover *A. pittii* from the white coat, the laboratory coat fragments were placed in a polypropylene tube with 5 mL saline solution and vigorously shaken with a vortex. During the experiments, samples from solid surfaces and saline microcosms were collected at different time-points (days 0, 1, 2, 3, 8, 15, 22, 29, 36, 43), serially diluted and used to inoculate LB agar or LB agar amended with sodium pyruvate (1% wt/vol) to determine the number of colony-forming units (cfu). Sodium pyruvate was added directly to LB agar prior to autoclaving [12,13].

Three independent experiments were performed. To determine the length of desiccation survival period and the regrowth capacity, recovered *A. pittii* cells were resuspended in LB broth and incubated for 48 h at 37°C . At the end of the new incubation period, optical density (OD) at 620 nm was recorded. Purity of cultures was confirmed by visual inspection on their colonial morphology after plating and by immunofluorescence staining with a specific antiserum against *A. pittii* [14].

Biofilm formation

Biofilm formation was estimated after addition of 1 mL of LB medium to all solid surfaces contained on 24-well plates according to previously described protocols [14]. Briefly, after addition of 1 mL LB medium, the microplates were incubated for 48 h at 37°C without shaking. Planktonic cells were removed, and wells were rinsed three times with distilled water, and the remaining adherent bacteria were stained with 1.5 mL/well of Crystal Violet [0.7% (wt/vol) solution] for 12 min. Excess stain was removed and Crystal Violet was extracted with 1.5 mL acetic acid (33%). Plates were incubated at room temperature in an orbital shaker for 1 min at 400 rpm to release the dye into the solution. Then a sample of 100 μ L was transferred to another 96-well flat-bottom plate, and the amount of dye (proportional to the density of adherent cells) was determined at 620 nm using a microplate reader (Multiskan FC; Thermo Fisher). In each experiment, results were corrected for background staining by subtracting the value for Crystal Violet bound to uninoculated controls. The biofilm assay was performed three times, with duplicates in each assay. To quantify specific biofilm-forming ability, the number of planktonic cells (cfu) was converted to a logarithmic scale, and normalized biofilms were calculated by dividing the total biofilm value (expressed as the OD₆₂₀) by the bacterial growth for each strain (expressed in cfu).

Confocal laser scanning microscopy

Bacteria viability during the survival assays on coverslips was determined as previously described [14]. Briefly, bacterial

viability was determined by using the BacLight Live/Dead kit (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA). Bacteria were stained for 20 min at room temperature in the dark. A series of optical sections was obtained with a Nikon A1R confocal scanning laser microscope (CLSM); the excitation wavelengths were 488 nm (green) and 561 nm (red), and 500–550 nm and 570–620 nm emission filters were used, respectively. Images were captured at random with a 20 \times Plan Apo (numerical aperture: 0.75) objective. Reconstructions of confocal sections were assembled using NIS-Elements software, version 3.2 (Nikon Instruments, Amsterdam, Netherlands). The volume measurement tool of the NIS-Elements software was used to record the relative biomass of live (green fluorescence) and dead cells (red fluorescence), expressed as μ m³. We then calculated the percentage of biomass that was alive, and the percentage of biomass that was dead, in all z-stack images from representative assays.

Statistics

All data were derived from three independent experiments. Statistical analysis of the data was carried out with Student's paired two-tailed *t*-test. *P* < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Figure 1 shows the culturability of the *A. pittii* strains on solid surfaces and in saline solution over a 43-day period. On average, *A. pittii* culturability was reduced by 77.3%, 80.9%,

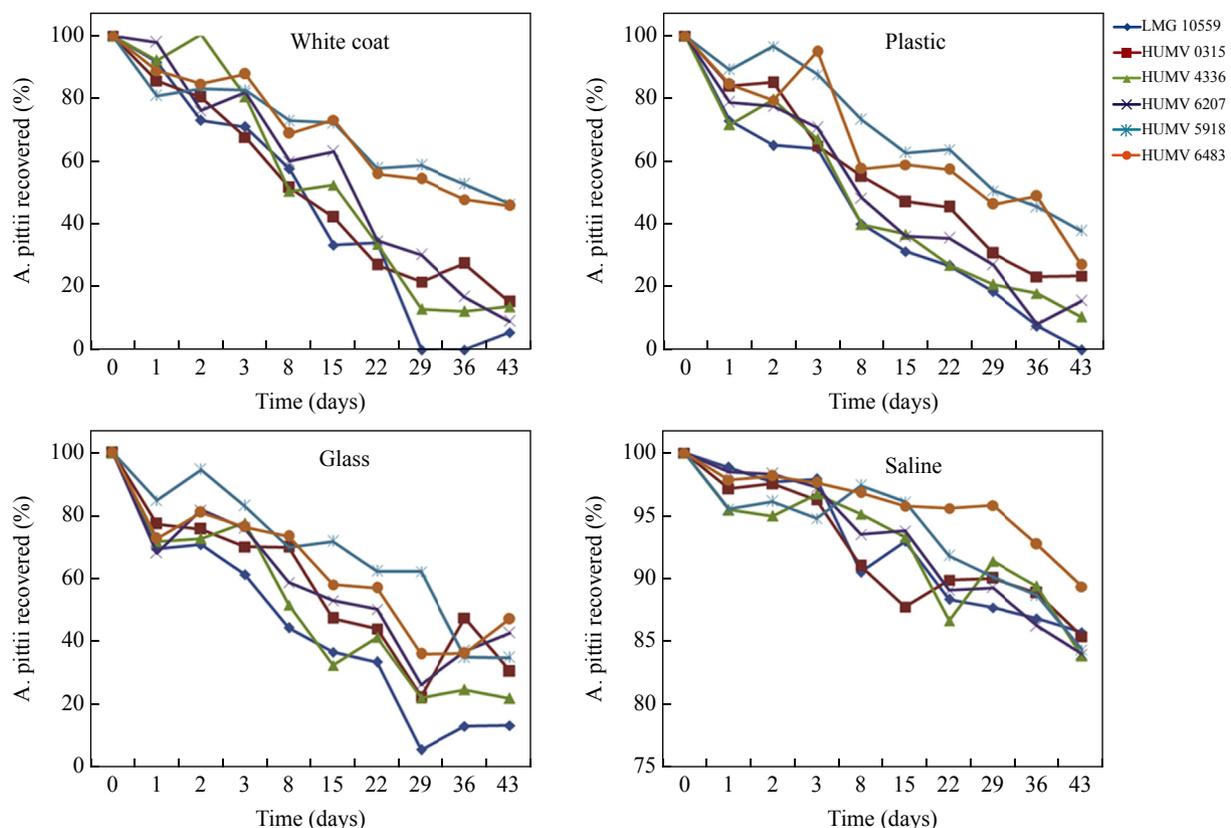


Figure 1. Survival times of strains inoculated on to white laboratory coat, plastic, or on glass coverslips (54.3% relative humidity) or suspended in sterile saline solution, and kept at room temperature. Colony counts on Luria Bertani agar determined cell survival. Each point represents the mean of three independent experiments expressed as percentage of reduction in culturability with respect to day 0 (100%).

68.1%, and 14.5% for white coat, plastic, glass and saline respectively. Significant statistical differences ($P < 0.05$) were found between strain LMG 10559 and HUMV 5918 on plastic and laboratory coat; between strain LMG 10559 and strain HUMV 6483 on laboratory coat; and between strain HUMV 6207 and strains HUMV 5918 and HUMV 6483 on the laboratory coat. No statistically significant differences were shown between strains in saline or on glass.

In two strains (5918 and 6483, isolated from a wound exudate and urine respectively) the culturability was only reduced in 53.5% and 54.1% on the white coat, indicating that nearly half the population survives on this surface for at least six weeks. Both strains also showed greater survival in glass, plastic, and saline environments. On the contrary, reference strain *A. pittii* LMG 10559 showed the lowest survival capacity under desiccation conditions. In experiments carried out on plastic and white coat solid surfaces, cfu declined below the detection limit.

When cfu were enumerated on LB agar supplemented with sodium pyruvate (recovery medium), a slight but non-significant positive effect on culturability was observed in all strains (Figure 2). On average, *A. pittii* culturability in this recovery medium was reduced by 74.3%, 79.7%, 70.3%, and 14% on white coat, plastic, glass, and in saline respectively. Again, the two isolates 5918 and 6483 showed high survival rate on white coat and plastic, as did strain 6483 on glass and in saline. The survival of both strains in white coat was reduced in 48.4% and 48.6% respectively.

Staining of *A. pittii* strains spotted on glass by using the BacLight Live/Dead bacterial viability kit (Figure 3) demonstrated the transition from largely viable populations (0 days, most of the cells fluoresced in green) to dead populations (red fluorescent cells). So, the presence of live bacteria could be detected after 43 days. Moreover, population dynamics differed between strains. After 15 days of desiccation, a large proportion of the cells of the strain LMG 10559 fluoresced in red, whereas most of the populations of HUMV 5918 and HUMV 6483 remained viable (Figure 3). Data from all strains are presented in Supplementary Figure 1 (Appendix A).

We added 1 mL of LB medium inside the wells containing white laboratory coat fragments, glass and plastic (bottom of wells) to study the ability of these remaining live populations to resume growth. Despite a great reduction in viability over time, populations recovered from starvation on solid-surface experiments retained their ability to regrow (as measured by OD₆₂₀) after rehydration with culture medium (Supplementary Figure 2; Appendix A). Colony-forming units were also counted at 0, 12, 24, and 48 h post hydration for each strain in each condition. Representative experiments for three strains are shown in Figure 4. We next tested the capability of these new populations to form biofilms by Crystal Violet assays (Figure 5). The number of cfu was converted to a logarithmic scale, and normalized biofilms were calculated by dividing the total biofilm value (expressed as the OD₆₂₀) by the bacterial growth for each strain (expressed in cfu) (Figure 5). The results indicate that these populations retain, or even increase, their

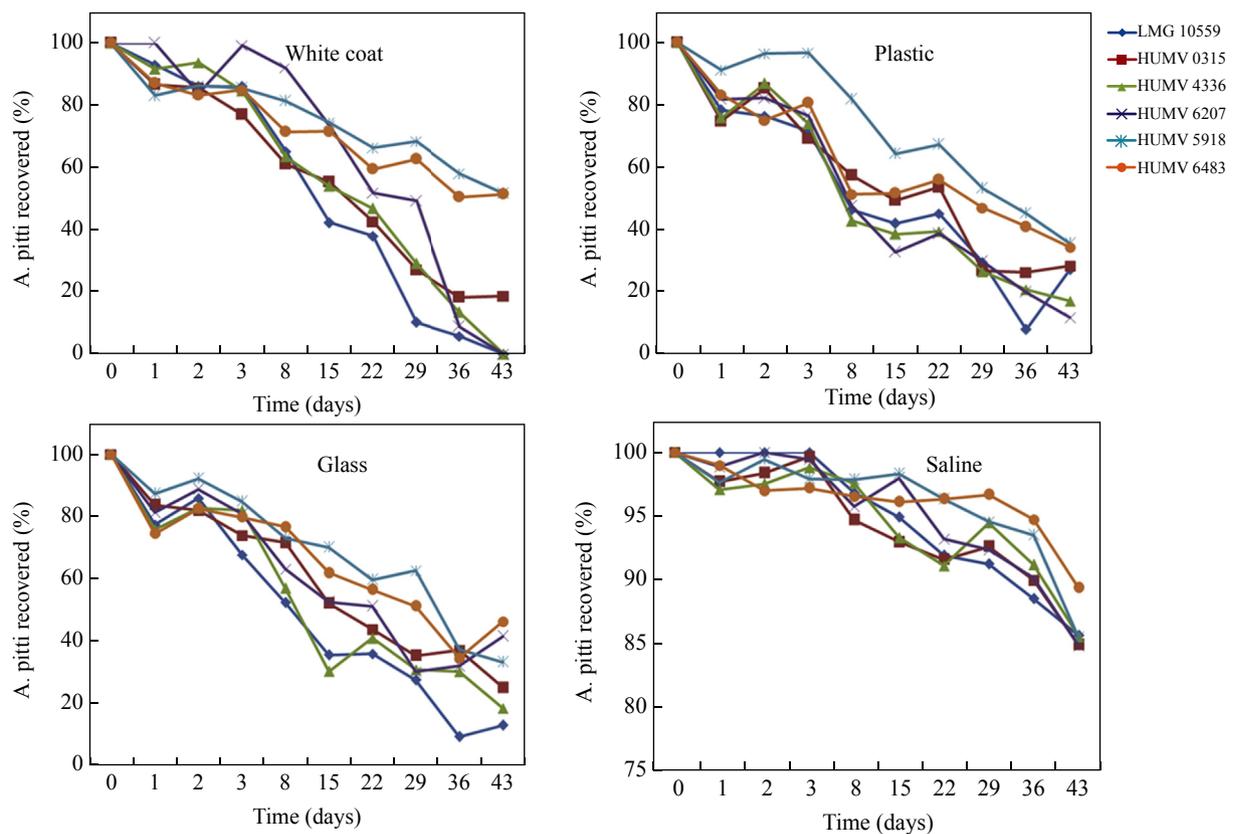


Figure 2. Survival times of strains inoculated on to white laboratory coat, plastic, or on glass coverslips (54.3% relative humidity) or suspended in saline and kept at room temperature. Colony counts on Luria Bertani agar supplemented with sodium pyruvate determined cell survival. Each point represents the mean of three independent experiments expressed as percentage of reduction in culturability with respect to day 0 (100%).

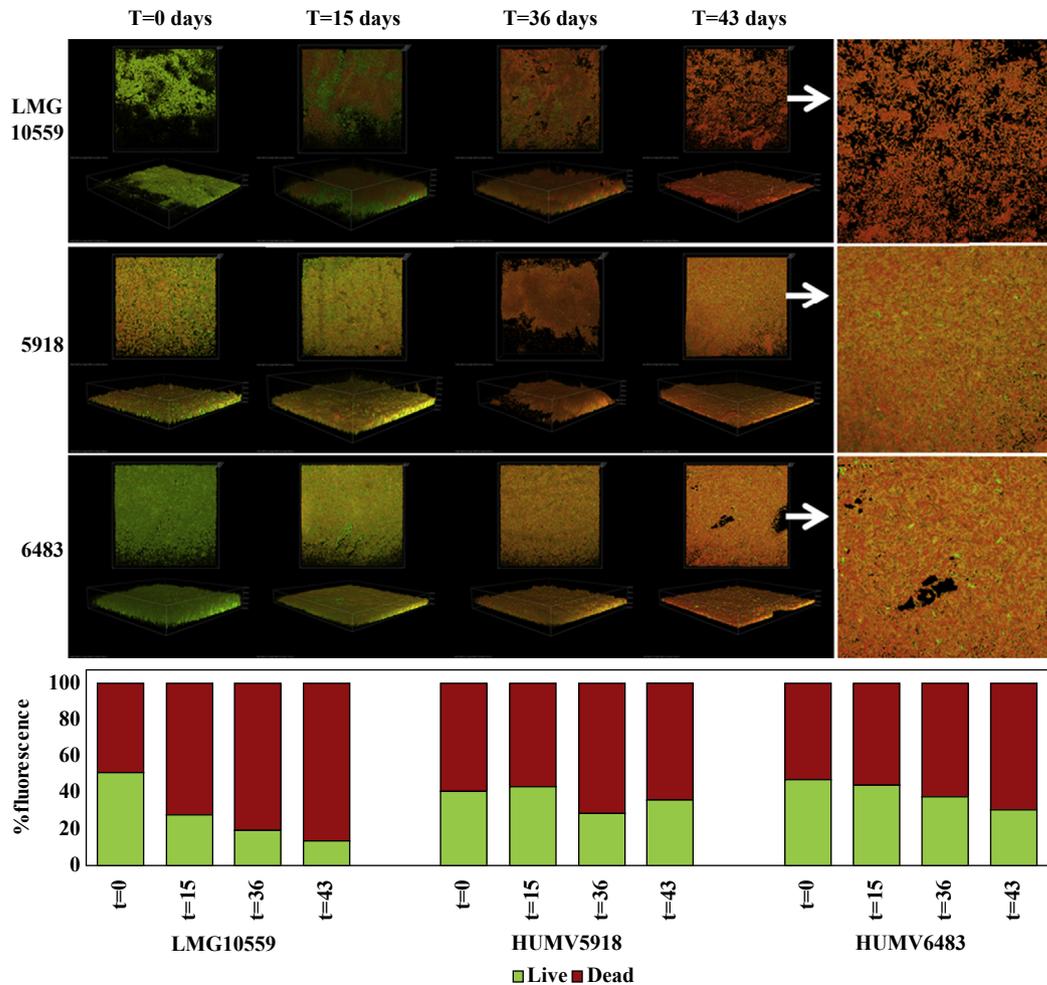


Figure 3. Confocal laser scanning microscope images of strains LMG, 5918, and 6483 after survival on to glass coverslips during different times. Bacteria were stained with the Live/Dead viability kit. Live cells fluoresce in green with Syto 9 dye and dead cells are stained red with propidium iodide. Arrows indicate a magnification (right panel) from a representative area of 43 days. Original magnification: $\times 600$. Lower panel: fluorescence (live/dead) for each strain represented in the upper panel, expressed as percentage.

ability to form biofilms after rehydration. Importantly, in both experiments, LMG 10559 regrew and formed biofilms even when culturable cells were below the detection limit ($T = 43$ days).

Discussion

Although interest in *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens has increased, little is known about their natural reservoirs and mode of transmission. Moreover, the ability of *Acinetobacter* spp. to survive on dry surfaces is central to our understanding of their epidemiology. One important factor contributing to the spread of *Acinetobacter* in hospital settings is its propensity to withstand desiccation and to survive on inert surfaces [8,9]. Wendt *et al.* have shown that the ability of *A. baumannii* strains to survive under dry conditions is correlated with the source of the strains. In that study, strains isolated from dry sources (pillow and a working surface) had better survival rates than strains isolated from wet sources (sewage and urine) [15]. According to several other authors, the ability of different strains of *A. baumannii* to survive

desiccation appears to vary greatly; some strains survived for several months without any reduction in colony counts, whereas other strains hardly survived the process of drying [11,15–18].

In contrast to *A. baumannii*, there are no detailed published reports on persistence of *A. pittii* clinical strains in the hospital settings. To learn more about its survival strategy and capacity to persist in that environment, we studied the effects of nutrient deprivation and dryness on the long-term survival of several *A. pittii* human clinical isolates and of a reference strain. Since different surfaces may influence the survival times, we used materials that are typical for the hospital environment, including a white laboratory coat used by professionals in the medical field and those involved in laboratory work. Our experiments with *A. pittii* cells retained on dry surfaces revealed that long-term survival was not influenced by the material because a constant reduction in culturability was observed on cotton, plastic and glass surfaces. The resistance to stressful conditions was moderate, with survival on dry surfaces being strain dependent, and the reference strain *A. pittii* LMG was the most susceptible to desiccation.

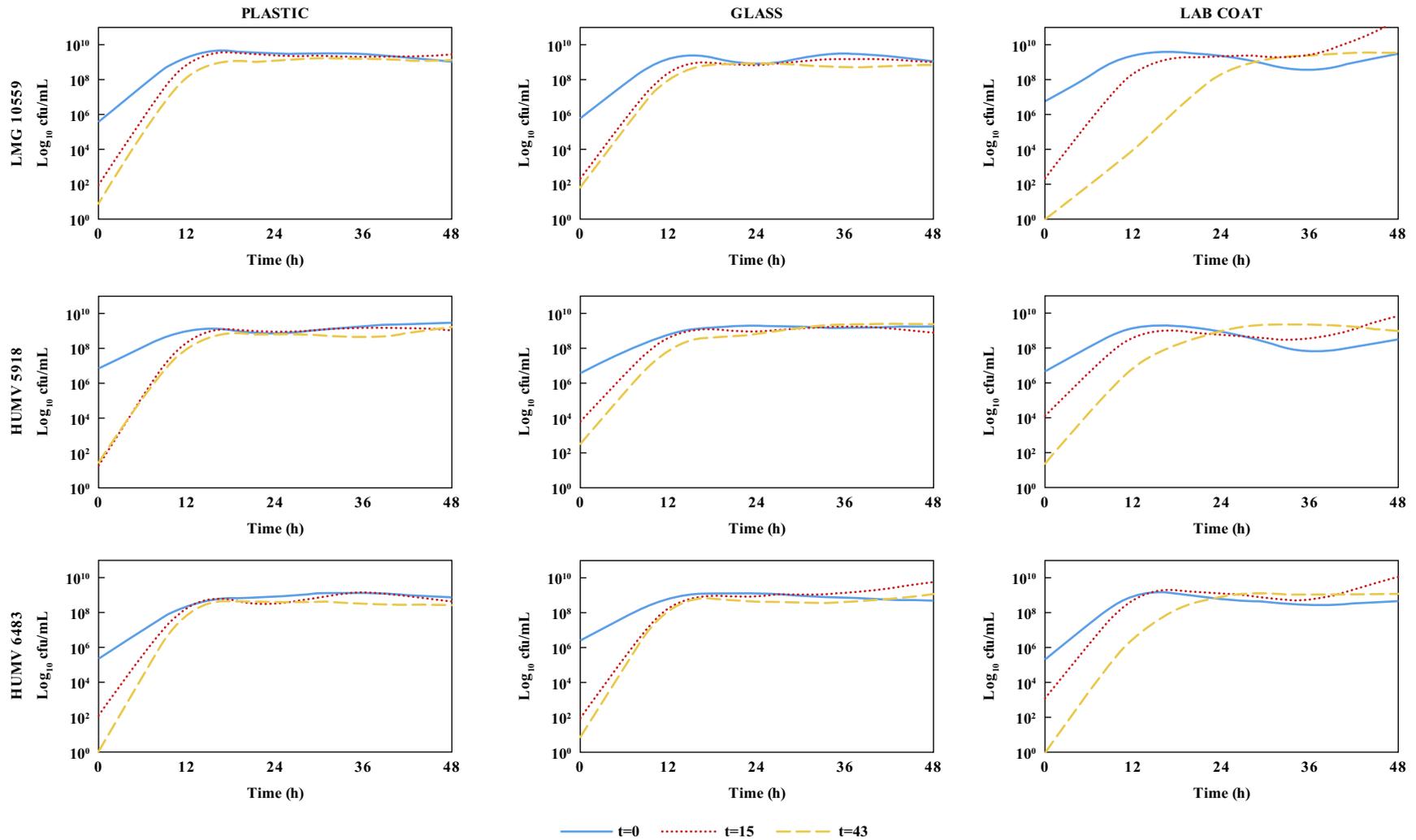


Figure 4. Estimation of regrowth capacity by enumeration of colony-forming units (cfu) in three strains. The cfu were counted at 0, 12, 24, and 48 h post hydration for each strain, in each condition.

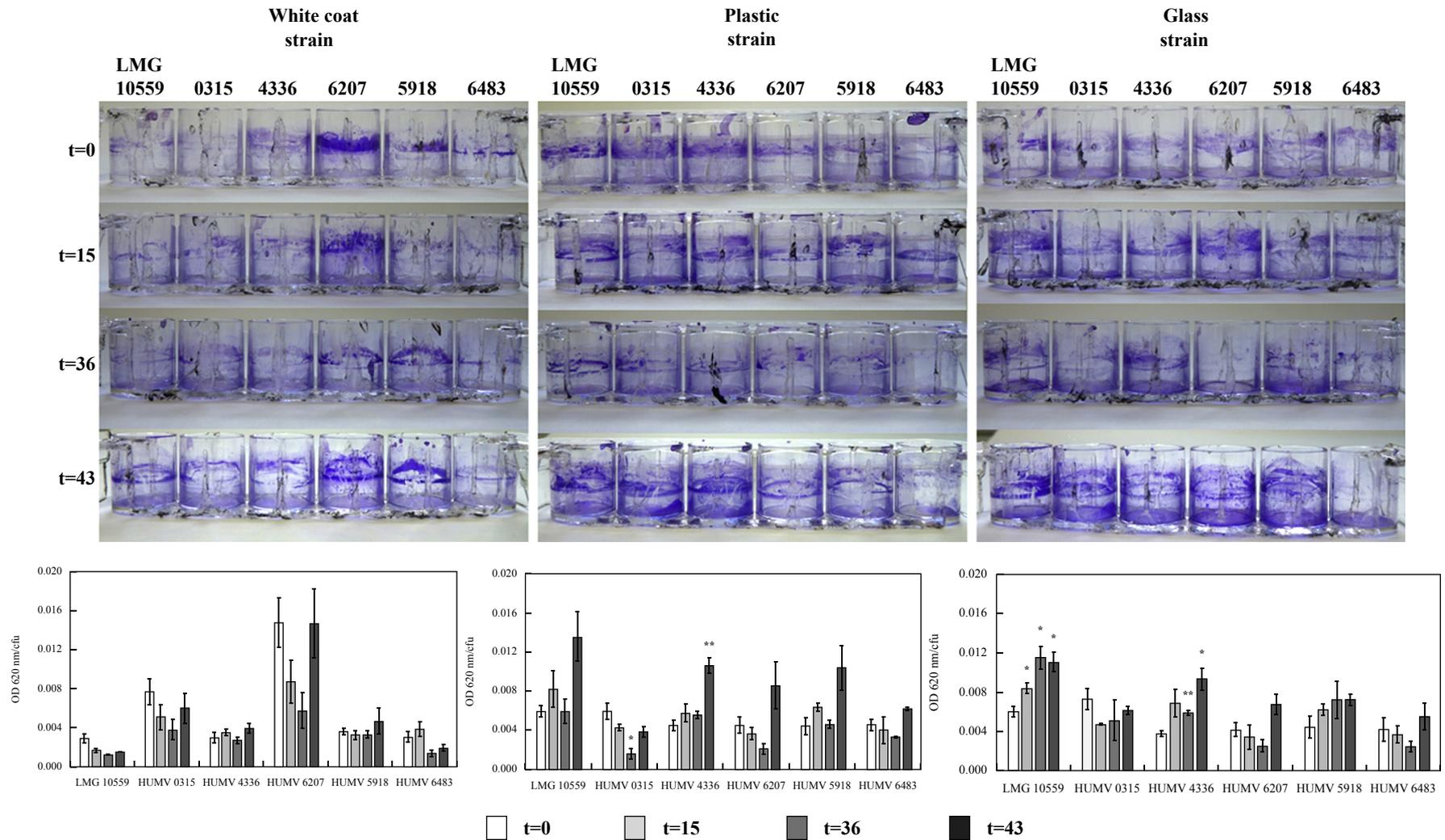


Figure 5. Biofilm formation by *Acinetobacter pittii* strains after desiccation and rehydration with Luria Bertani (LB) medium. Representative examples are shown of biofilm formation in 24-well plates by the six *A. pittii* strains spotted on to various surfaces after rehydration and growth in LB medium for 48 h at 37°C. Wells were stained with Crystal Violet (upper panel). Quantification of biofilm formation was performed after Crystal Violet extraction and measurement (OD₆₂₀). Lower panel: normalized biofilm formation, calculated as total biofilm (expressed as the OD₆₂₀) divided by growth (expressed in cfu). Values are presented as mean ± standard deviation of three independent experiments. **P* < 0.05; ***P* < 0.01.

Jawad *et al.* studied the influence of relative humidity on survival of two *A. pittii* strains on dry surfaces [8]. They used one strain isolated from human cerebrospinal fluid and another from an unspecified source. These strains survived at room temperature for up to five or 10 days respectively when bacteria were suspended in distilled water and placed on glass coverslips. Staining of *A. pittii* strains spotted on glass clearly demonstrated the presence of cells with intact cell membranes after long-term survival. As a decline in culturability after long periods of incubation in several microcosms may be due either to cell death or to entry into a viable but non-culturable (VBNC) state, we tested a method for in-vitro resuscitation. As sodium pyruvate and H₂O₂-degrading agents seem to be effective compounds for recovering the physiological state after cell damage or a loss of culturability, we wanted to know whether there is any effect on culturability in *A. pittii* stressed cells by adding sodium pyruvate to the recovery medium [17,19]. The loss of viability and culturability on this solid surface indicates that a great fraction of the population underwent cellular membrane damage and that the VBNC state was not induced under these conditions.

Acinetobacter pittii survival in the liquid environment was greater than on solid surfaces. On average, *A. pittii* culturability was reduced by >68% in solid surfaces but only by 14.5% in saline. Our results with *A. pittii* on dry surfaces are in contrast with those of several authors studying *A. baumannii* because in those data the culturability of *A. baumannii* population did not change significantly for at least one month [9,15,17]. Otherwise, any conclusions on the correlation between survival under laboratory conditions resembling hospital settings must take into account the fact that most transmission occurs via the hands of healthcare workers. These hands transport bacteria from inert surfaces to patients [20]. Once transported, stressed bacteria must be able to recover from their state by fast adaptation to a new warm and nutrient-rich environment inside a new patient. As those bacteria under stress should conserve factors that favour infection, we wanted to investigate bacterial behaviour after rehydration with rich media containing nutrients, in a warm temperature (37°C), simulating conditions close to those in a new patient/host.

Interestingly, despite a great reduction in culturability over time, all strains are able to maintain their capacity to form biofilms after rehydration, addition of nutrients, and changing temperature. Rehydration enables cells to recover membrane fluidity associated with cell proliferation capabilities [21]. The bacteria demonstrated a rapid adaptation to the temperature shift (from room temperature to 37°C) and nutrient availability (from starvation to food availability); conditions that may easily be found in a new patient host. The data presented contribute to a better understanding of the behaviour of *A. pittii* on inanimate surfaces. Our findings are also consistent with the observed tendency of other *Acinetobacter* species to survive on dry surfaces, and their ability to be transferred under dry conditions in a hospital environment during nosocomial infection outbreaks.

Survival of the two *A. pittii* strains on white laboratory coat fragments is remarkable. In a recent study, Munoz-Price found concordance between contamination of hands of healthcare workers and their white coats [22]. Their results include strains of *Acinetobacter* spp. as found as contaminants.

As patients continuously shed infectious bacteria in the hospital environment and health professionals are in constant

contact with these patients, there is a need to promote scrupulous handwashing and to search for alternatives to white coats [23]. In addition, healthcare workers often walk from healthcare facilities to other public places such as cafeterias and hospital annexes wearing their work clothing, creating another route by which micro-organisms can be exported from and imported into the healthcare environment [23,24]. Although there have been no studies directly linking white coats with infection transmission in *Acinetobacter*, the fact that they could be contaminated, and transport viable and culturable pathogens over time, suggests the need for further research.

Conflict of interest statement

None declared.

Funding sources

Z.B. holds a contract from the University of the Basque Country. I.C.-G. holds a contract from the Instituto de Investigación Sanitaria Valdecilla IDIVAL (AIP14/01/PI13/01310). M.L.-D. holds a contract from the Instituto de Investigación Sanitaria Valdecilla IDIVAL and Universidad de Cantabria (PREVAL16/05). The authors thank Dr F. Madrazo (Technology Support Services, IDIVAL) for helping with confocal microscopy and Dr I. Arana for his excellent assistance in the preparation of the manuscript. J.R.-V. acknowledges the receipt of a SEIMC fellowship. Research in our laboratory is supported by the Spanish Instituto de Salud Carlos III, Spain (grants PI13/01310 and PI16/01103) and the Plan Nacional de I+D+i 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 RD16/0016/0007) – co-financed by European Development Regional Fund 'A way to achieve Europe' ERDF and operative program Intelligent Growth 2014–2020.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2017.07.031>.

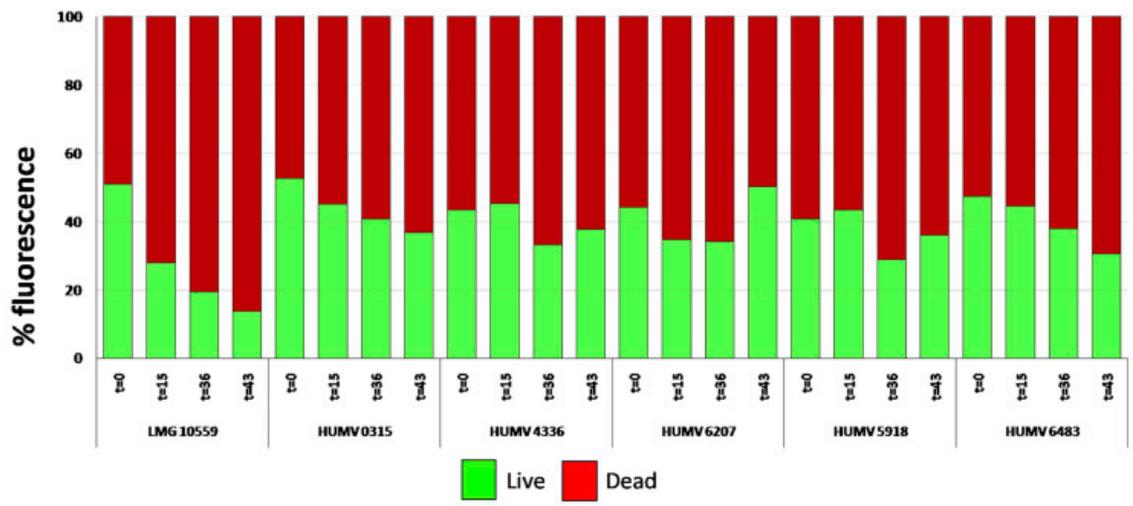
References

- [1] Chusri S, Chongsuvivatwong V, Rivera JI, Silpapojakul K, Singkhaman K, McNeil E, et al. Clinical outcomes of hospital-acquired infection with *Acinetobacter nosocomialis* and *Acinetobacter pittii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:4172–9.
- [2] Falagas ME, Rafailidis PI. Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii*: no longer a controversial issue. *Crit Care* 2007;11:134.
- [3] Bergogne-Berezin E, Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev* 1996;9:148–65.
- [4] Bogaerts P, Huang TD, Rezende de Castro R, Bouchahrouf W, Glupczynski Y. Could *Acinetobacter pittii* act as an NDM-1 reservoir for Enterobacteriaceae? *J Antimicrob Chemother* 2013;68:2414–5.
- [5] Pailhories H, Hadjadj L, Mahieu R, Crochette N, Rolain JM, Kempf M. Fortuitous diagnosis of NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* carriage in a patient from France with no recent history of travel. *J Antimicrob Chemother* 2016;72:942–4.

- [6] Peleg AY, de Brij A, Adams MD, Cerqueira GM, Mocali S, Galardini M, et al. The success of acinetobacter species; genetic, metabolic and virulence attributes. *PLoS One* 2012;7:e46984.
- [7] Lazaro-Diez M, Navascues-Lejarza T, Remuzgo-Martinez S, Navas J, Icardo JM, Acosta F, et al. *Acinetobacter baumannii* and *A. pittii* clinical isolates lack adherence and cytotoxicity to lung epithelial cells in vitro. *Microbes Infect* 2016;18:559–64.
- [8] Jawad A, Seifert H, Snelling AM, Heritage J, Hawkey PM. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. *J Clin Microbiol* 1998;36:1938–41.
- [9] 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.
- [10] Allen KD, Green HT. Hospital outbreak of multi-resistant *Acinetobacter anitratus*: an airborne mode of spread? *J Hosp Infect* 1987;9:110–9.
- [11] Kramer A, Schwebke I, Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis* 2006;6:130.
- [12] Oliver JD. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 2010;34:415–25.
- [13] Li L, Mendis N, Trigui H, Oliver JD, Faucher SP. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Front Microbiol* 2014;5:258.
- [14] Remuzgo-Martinez S, Lazaro-Diez M, Mayer C, Aranzamendi-Zaldumbide M, Padilla D, Calvo J, et al. Biofilm formation and quorum-sensing-molecule production by clinical isolates of *Serratia liquefaciens*. *Appl Environ Microbiol* 2015;81:3306–15.
- [15] Wendt C, Dietze B, Dietz E, Ruden H. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *J Clin Microbiol* 1997;35:1394–7.
- [16] Jawad A, Heritage J, Snelling AM, Gascoyne-Binzi DM, Hawkey PM. Influence of relative humidity and suspending menstrua on survival of *Acinetobacter* spp. on dry surfaces. *J Clin Microbiol* 1996;34:2881–7.
- [17] Bravo Z, Orruno M, Parada C, Kaberdin VR, Barcina I, Arana I. The long-term survival of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606(T) under nutrient-deprived conditions does not require the entry into the viable but non-culturable state. *Archs Microbiol* 2016;198:399–407.
- [18] Gastmeier P, Schwab F, Barwolff S, Ruden H, Grundmann H. Correlation between the genetic diversity of nosocomial pathogens and their survival time in intensive care units. *J Hosp Infect* 2006;62:181–6.
- [19] Vivas J, Carracedo B, Riano J, Razquin BE, López-Fierro P, Acosta F, et al. Behavior of an *Aeromonas hydrophila* aroA live vaccine in water microcosms. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:2702–8.
- [20] Weinstein RA. Epidemiology and control of nosocomial infections in adult intensive care units. *Am J Med* 1991;91:1795–845.
- [21] Lemke MJ, Leff LG. Culturability of stream bacteria assessed at the assemblage and population levels. *Microb Ecol* 2006;51:365–74.
- [22] Munoz-Price LS, Arheart KL, Mills JP, Cleary T, Depascale D, Jimenez A, et al. Associations between bacterial contamination of health care workers' hands and contamination of white coats and scrubs. *Am J Infect Control* 2012;40:e245–8.
- [23] Mitchell A, Spencer M, Edmiston Jr C. Role of healthcare apparel and other healthcare textiles in the transmission of pathogens: a review of the literature. *J Hosp Infect* 2015;90:285–92.
- [24] Wong D, Nye K, Hollis P. Microbial flora on doctors' white coats. *BMJ Clin Res Ed* 1991;303:1602–4.

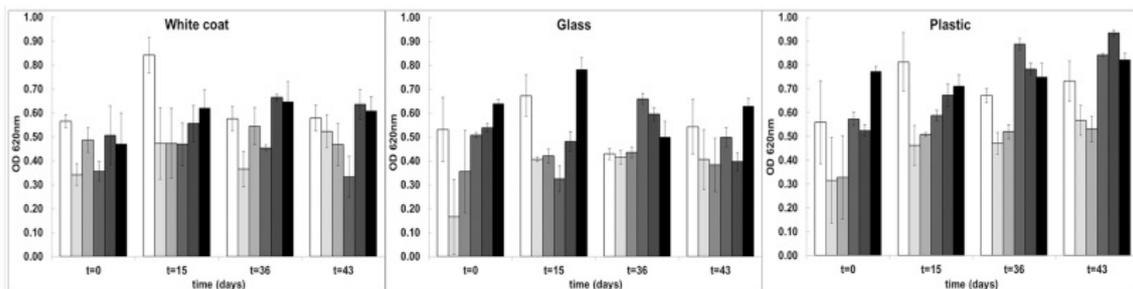
Appendix A

Supplementary data



Supplementary Figure 1

Confocal scanning laser microscopy. Fluorescence (live/dead) expressed as percentage, for each strain, at different time-points.



Supplementary Figure 2

Regrowth capacity estimated for *Acinetobacter pittii* populations maintained on solid surfaces at time zero or at different time-points after desiccation. Stressed populations were resuspended in LB medium, incubated for 48 h at 37°C and the OD_{620nm} of bacterial cultures was measured. Columns, from white to black: strains LMG, HUMV 0315, HUMV 4336, HUMV 6207, HUMV 5918, and HUMV 6483. Values are presented as mean ± standard deviation (SD) of three independent experiments.

RESEARCH ARTICLE

Acinetobacter baumannii maintains its virulence after long-time starvation

Itziar Chapartegui-González^{1,2}, María Lázaro-Díez^{1,2,3}, Zaloa Bravo¹, Jesús Navas^{1,4}, José M. Icardo⁵, José Ramos-Vivas^{1,2,3*}

1 Instituto de Investigación Valdecilla IDIVAL, Santander, Spain, **2** Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, Spain, **3** Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain, **4** Departamento de Biología Molecular, Universidad de Cantabria, Santander, Spain, **5** Departamento de Anatomía y Biología Celular, Universidad de Cantabria, Santander, Spain

* jvivas@idival.org



Abstract

Acinetobacter baumannii is a cause of healthcare-associated infections. Although *A. baumannii* is an opportunistic pathogen, its infections are notoriously difficult to treat due to intrinsic and acquired antimicrobial resistance, often limiting effective therapeutic options. *A. baumannii* can survive for long periods in the hospital environment, particularly on inanimate surfaces. Such environments may act as a reservoir for cross-colonization and infection outbreaks and should be considered a substantial factor in infection control practices. Moreover, clothing of healthcare personnel and gadgets may play a role in the spread of nosocomial bacteria. A link between contamination of hospital surfaces and *A. baumannii* infections or between its persistence in the environment and its virulence has not yet been established. Bacteria under stress (i.e., long-term desiccation in hospital setting) could conserve factors that favor infection. To investigate whether desiccation and/or starvation may be involved in the ability of certain strains of *A. baumannii* to retain virulence factors, we have studied five well-characterized clinical isolates of *A. baumannii* for which survival times were determined under simulated hospital conditions. Despite a considerable reduction in the culturability over time (up to 88% depending on strain and the condition tested), some *A. baumannii* strains were able to maintain their ability to form biofilms after rehydration, addition of nutrients, and changing temperature. Also, after long-term desiccation, several clinical strains were able to grow in the presence of non-immune human serum as fine as their non-stressed homologs. Furthermore, we also show that the ability of bacterial strains to kill *Galleria mellonella* larvae does not change although *A. baumannii* cells were stressed by long-term starvation (up to 60 days). This means that *A. baumannii* can undergo a rapid adaptation to both the temperature shift and nutrients availability, conditions that can be easily found by bacteria in a new patient in the hospital setting.

OPEN ACCESS

Citation: Chapartegui-González I, Lázaro-Díez M, Bravo Z, Navas J, Icardo JM, Ramos-Vivas J (2018) *Acinetobacter baumannii* maintains its virulence after long-time starvation. PLoS ONE 13 (8): e0201961. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201961>

Editor: Vishnu Chaturvedi, Wadsworth Center, UNITED STATES

Received: March 22, 2018

Accepted: July 25, 2018

Published: August 22, 2018

Copyright: © 2018 Chapartegui-González et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: Research in our laboratory is supported by the Spanish Instituto de Salud Carlos III, Spain (grant PI16/01103 to José Ramos-Vivas) and the Plan Nacional de I+D+i 2008-2011 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) - co-financed by European Development Regional Fund "A way to achieve Europe" ERDF. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

A. baumannii is a non-motile opportunistic extracellular human pathogen. Antibiotic-resistant *A. baumannii* has emerged as one of the most problematic nosocomial pathogens [1]. While more than 80 complete genome sequences of several strains of *A. baumannii* have been published, only very few potential virulence factors have been implicated in its disease pathogenesis [2]. The outer membrane protein (OmpA) and a capsular polysaccharide seem to be involved in the interaction with epithelial cells *in vitro* or in virulence [3, 4]. Other surface components or secreted proteins play a minor role both *in vitro* or *in vivo*. With these limited number of virulence factors, it has been suggested that the fulminant course of disease might be due to exaggerated host response to *A. baumannii* lipopolysaccharide [5–8].

As with other non-fermentative Gram-negative bacilli, *A. baumannii* can develop resistance to all classes of antimicrobials; and multi-drug resistant (MDR) isolates are sharply increasing in frequency, forcing clinicians to use last resort antibiotics such as colistin [9–11]. Several studies showed the presence of this pathogen in various hospital environments where *A. baumannii* is transmitted by direct contact with infected patients or indirect contact with contaminated inanimate surfaces [12–14]. Importantly, cross-transmission of microorganisms from abiotic surfaces may have a significant role in ICU-acquired infections [15–17].

One important factor contributing to the spread of *A. baumannii* in these environments seems to be its capacity to withstand desiccation and starvation [18–20]. Also, it can produce biofilms, a community of bacteria enclosed within a protective polymeric matrix [21]. This ability to form biofilms is another potential virulence factor because it increases the survival rate of this bacterium on dry surfaces and may contribute to its persistence in the hospital environment, increasing the probability of causing nosocomial infections and outbreaks [1].

Despite the link among contamination, *Acinetobacter* survival in the patient care environment and the risk of healthcare-associated infections have not yet been established, gaining insight into the mechanisms of long-term persistence of this pathogen in hospital settings is fundamental to prevent clonal spread, and to the development of novel targets for both diagnostic tests and therapeutic agents. There is a knowledge gap concerning the bacterial transition from a stressed state (i.e., on inanimate surfaces) to a new environment with available nutrients and higher temperature (i.e., inside a new host). Those bacteria under stress should conserve or express factors that may favor subsequent colonization or infection. We want to test this hypothesis by passing stressed cells into a favorable environment which simulates a new host.

Materials and methods

Bacterial strains

Four *A. baumannii* clinical isolates were used in this work. All clinical isolates were obtained from different patients (standard service of routine) at the Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. HUMV-1319 and HUMV-3743 were isolated from wound exudate, HUMV-2471 was isolated from sputum and HUMV-2790 was isolated from skin ulcer. Reference strain *A. baumannii* ATCC[®] 19606^T was also included. *A. baumannii* strains were routinely cultured on blood agar (BA) plates, or Luria broth (LB) at 37°C and stock cultures were frozen at -80°C with 20% (vol/vol) glycerol. For inocula preparation, strains were grown at 37°C in LB with shaking (175 rpm) for 24 h. Cells were collected by centrifugation (1.258 g for 20 min) and washed three times with sterile saline solution (0.9% wt/vol NaCl). Finally, cell pellets were suspended in sterile saline solution. *Escherichia coli* DH10B and BL21 strains were used as positive controls for serum susceptibility.

Bacterial growth curves

Growth curves were carried out to confirm that the strains used in our study grew at similar growth rate. Bacteria from overnight cultures were diluted 1,000 folds in LB and were then inoculated into each well of a 96-well polystyrene flat-bottom microtiter plates and incubated at 37°C for 24 h inside an Infinite® 200 microplate reader (Tecan). The plates were read every 30 minutes for 24 h at wavelengths of 600 nm with shaking before each cycle.

Long-term survival assays

A. baumannii cells from stationary phase were incubated at 22°C in liquid or solid environments. Starvation was implemented by incubating cells in sterile saline solution or onto sterile cotton white lab coat fragments (~1 cm²), plastic (bottom of wells in 24-well plates (1.9 cm², Corning™ Costar™, Fisher Scientific)), or sterile glass cover slides (12 mm diameter, 1.13 cm²). For survival assays onto solid surfaces, glass cover slides, plastic, or white lab coat fragments were inoculated with 50 µl spots of *A. baumannii* at a cell density of ~10⁷ cells ml⁻¹. Cover slides and white lab coat fragments were sterilized by autoclaving (121°C/20 min) and 24-well plates were purchased from Fisher Scientific (individually wrapped, sterilized by gamma irradiation). For survival assays in the aqueous environment, experiments were carried out in 50 ml polypropylene tubes (Fisher Scientific) containing 15 ml of sterile saline solution reaching a bacterial density of ~10⁷ cells ml⁻¹.

Solid environments (cover slides, fragments of white lab coats, and plastic) were placed in wells of several 24-well plates in the dark. Ambient relative humidity and temperature were measured with a hygrometer/thermometer (Thermo Hygro) and maintained at a relatively low humidity level (54 ± 1.6% humidity) and room temperature (RT) 22 ± 0.2°C.

Populations from solid surfaces were recovered adding 1 ml of saline solution to a glass or plastic surfaces and scraping off the cells from the bottom using a 200 µl tip. To recover *A. baumannii* from the white lab coat, the coat fragments were placed in a 15 ml polypropylene tube with 5 ml of saline solution and vigorously shaken with a vortex.

During long-time survival experiments, samples from solid surfaces and saline microcosms were collected at different time points (days 0, 1, 3, 10, 20, 30, 40, 50, 60), serially diluted in saline solution and used to inoculate Luria agar (LA) or LA amended with sodium pyruvate (0.5% wt/vol) [22, 23] to determine the number of colony-forming units (CFUs). Sodium pyruvate was added directly to LA before autoclaving.

Along the desiccation survival period or long-term starvation in saline, and to determine the regrowth capacity, recovered *A. baumannii* cells from solid media were resuspended in 1 ml of LB. For saline, 5 µl of the bacterial suspensions were inoculated into 1 ml of LB. These bacterial cultures were placed in wells of 24-well plates and incubated for 48 h at 37°C. Visual inspection confirmed the purity of cultures on their colonial morphology after plating and by immunofluorescence staining with a specific antiserum against *A. baumannii* [24]. Three long-time survival independent experiments were performed.

Biofilm formation

Biofilm formation capacity of stressed cells and fresh inocula was estimated after addition of 1 ml of LB medium to all solid surfaces contained on 24-well plates (white lab coat, plastic, and glass) and 5 µl of the bacterial inocula for saline, according to previously described protocols [25]. Briefly, after addition of 1 ml LB medium, the microplates were incubated for 48 h at 37°C without shaking. Planktonic cells were removed, and wells were rinsed three times with distilled water, and the remaining adherent bacteria were stained with 1.5 ml/well of crystal violet (CV) (0.7% [wt/vol] solution) for 12 min. Excess stain was removed by washing with

distilled water, and CV was extracted with 1.5 ml of acetic acid (33%). Plates were incubated at RT in an orbital shaker for 1 min at 400 rpm to release the dye into the solution. Then, a sample of 100 μ l was transferred to another 96-well flat-bottom plate, and the amount of dye (proportional to the density of adherent cells) was determined at 620 nm using a microplate reader (Multiskan FC; Thermo Fisher). In each experiment, results were corrected for background staining by subtracting the value for crystal violet bound to uninoculated controls. The number of planktonic cells (CFUs) was converted to a logarithmic scale, and normalized biofilms were calculated by dividing the total biofilm value (expressed as the OD₆₂₀) by the bacterial growth for each strain (expressed in CFUs). The biofilm assay was performed three times, with duplicates in each assay.

Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

Bacterial viability during the survival assays on cover slides was determined as previously described [26]. Briefly, bacteria were stained using the BacLight LIVE/DEAD kit (Molecular Probes Inc.) for 20 min at RT in the dark. A series of optical sections were obtained with a Nikon A1R confocal scanning laser microscope; the excitation wavelengths were 488 nm (green) and 561 nm (red), and 500 to 550 nm and 570 to 620 nm emission filters were used, respectively. Images were captured at random with a 40 \times Plan Apo (numerical aperture [NA], 0.75) objective. Reconstructions of confocal sections were assembled using NIS-Elements software, version 3.2. The volume measurement tool of the NIS-Elements software was used to readily recognize the relative biomass of live (green fluorescence) and dead cells (red fluorescence). The percentage of biomass that was alive and the percentage of biomass that was dead in all z-stack images from representative assays was calculated.

Galleria mellonella killing assays

G. mellonella caterpillars in the final-instar larval stage (Bichosa, Salceda de Caselas, Galicia, Spain) were stored in the dark and used within 3 days from the day of shipment. Caterpillars (250 \pm 25 mg in body weight) were employed in all assays.

Two strains of *A. baumannii* were arbitrarily selected (HUMV-2790 and HUMV-1319) after starvation in saline solution (60 days). Bacterial suspensions were adjusted to $\sim 10^7$ CFUs ml⁻¹, and the same bacterial suspension was prepared from a fresh culture of these strains. Bacterial infection of *G. mellonella* was carried out primarily as described by Peleg et al. [27]. Briefly, a 10⁻¹ Hamilton syringe was used to inject 10 μ l aliquots of the inocula into the hemocoel of each caterpillar via the last left proleg. Ten *G. mellonella* larvae were injected with $\sim 10^5$ bacteria and were placed in a 9.0 cm Petri dish lined with 8.5 cm Whatman paper, then incubated at 37°C in the dark.

Bacterial colony counts on LA were used to confirm all inocula. Larvae were individually examined for melanization, and time of death was recorded. Caterpillars were considered dead when they displayed no movement in response to touch. Assays were allowed to proceed for only 4 days as pupa formation could occasionally be seen by day 4. Two independent replicates of each infection experiment were performed per infection strain. Two negative control groups were always prepared: one group that underwent no manipulation to control for background larval mortality (no manipulation control) and one group (uninfected control) that was injected with saline solution to control for the impact of physical trauma.

Serum bactericidal assays

All studies involving human samples were performed following international standards for research ethics and were approved by the local institutional review board (Hospital

Universitario Marqués de Valdecilla). Human sera were isolated from whole venous blood obtained from healthy human volunteers after informed consent. Venous blood was drawn aseptically and allowed to clot, and the serum was separated by centrifugation. Complement was inactivated by heating serum at 56°C for 30 minutes when required. Two different final serum concentrations (25% and 50%) of normal (N) and inactivated (I) human serum (prepared in PBS) were used against 2 clinical strains maintained for 60 days under starvation (HUMV-1319 and HUMV-2790). CFUs were determined at 0, 30, 90 and 180 min by serial dilution and cultured in LA plates. Experiments were performed three times.

Scanning Electron Microscopy (SEM)

Bacterial presence in white lab coats was analyzed qualitatively using scanning electron microscopy. White lab coats fragments infected with *A. baumannii* inside 24-well plates at time 1 h or after 60 days were processed directly inside the plates. The entire wells were fixed with ice-cold 3% glutaraldehyde for 20 min at 4°C. Samples were then dehydrated in a graded ethanol series, cut into small pieces, dried by the critical point method, coated with gold in a Fine Coat ion sputter (JFC-1100; JEOL), and observed with an Inspect S microscope (FEI Company) working at 15 or 20 kV. Uninoculated autoclaved white lab coat fragments were used as the control for the presence of bacteria.

Statistics

Data were described with means and Standard deviation and median and interquartile range when appropriate. Dichotomous variables were described with percentages. Comparisons of the quantitative data was carried out by comparing means with the paired Student t-test. The alpha error was set at 0.05, and all *p* values were bilateral. In addition, for dichotomous variables, survival curves were obtained and equality of survival distributions was tested by using the Log Rank (Mantel-Cox) test. We conducted all statistical analyses using Microsoft® Excel version 16.14.1. *G. mellonella* mortality curves were plotted using the Graph Pad Prism version 7.0a.

Results

The effects of time (60 days period) and nutrient deprivation upon culturability of *A. baumannii* populations on solid surfaces and saline solution are shown in Fig 1. On average, *A. baumannii* culturability was reduced by 46.66%, 40.40%, 71.78%, and 11.94% in plastic, glass, white lab coat, and saline, respectively. The less resistant strain on solid surfaces was the reference strain ATCC® 19606^T where its culturability was reduced in 59.68%, 58.95%, and 88.11% in plastic, glass, and white lab coat, respectively. The most resistant strain on plastic and glass was HUMV-1319, with survival rates of 67.51% and 74.76%, respectively. Strain HUMV-2471 was the most persistent on white lab coat fragments, with a reduction of 54.88% in culturability on this surface after 60 days, indicating that near half the population of this strain survive on a white lab coat for at least two months.

The effect of starvation on bacterial populations maintained under starvation in saline solution was minimal. In all cases, we observed that strains kept survival rates above 83%, and did not change throughout the experiment's duration.

When colony-forming units were enumerated on LA supplemented with sodium pyruvate (recovery medium), no significant differences were found ($p > 0.05$, data not shown).

We tested the capability of the starved bacterial survivors to resume growth and to express adherence factors to form biofilms by CV assays. Despite a reduction in culturability over 60

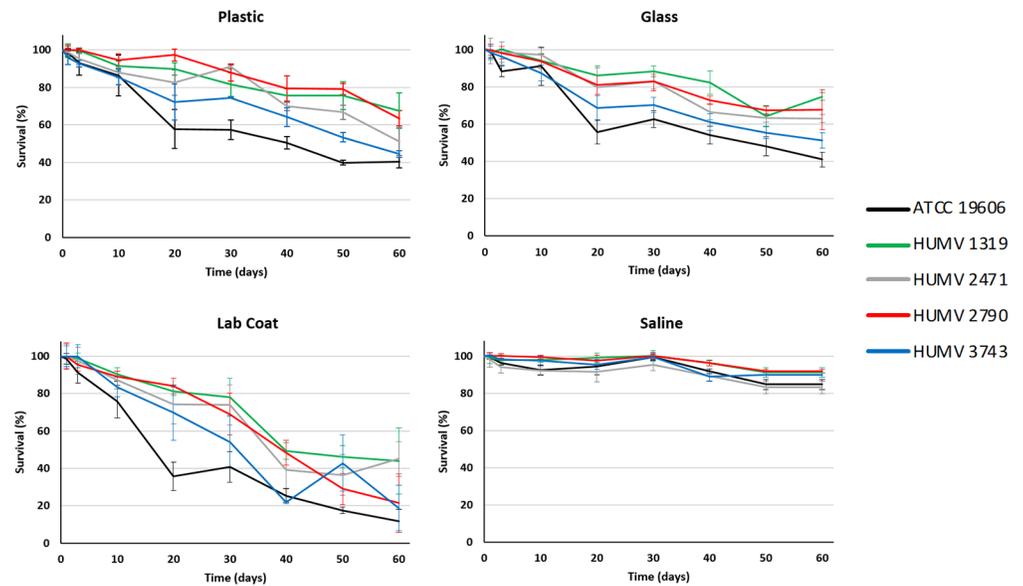


Fig 1. Survival of *A. baumannii* strains in different environments. Survival times of strains inoculated onto white lab coat, plastic, or in glass coverslips (54% relative humidity), or suspended in sterile saline solution, and kept at room temperature. Colony counts on LA determined cell survival. Each point represents the mean of three independent experiments expressed as a reduction in culturability with respect to day 0 (100%). Error bars show the standard error of the mean.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201961.g001>

days, some populations recovered from starvation on solid surface experiments and retained their ability to regrow and to form biofilms after rehydration with culture medium (S1 Fig).

The number of CFU was converted to a logarithmic scale, and normalized biofilms were calculated by dividing the total biofilm value (expressed as the OD₆₂₀) by the bacterial growth for each strain (expressed in CFUs) (Fig 2).

Growth curves confirmed that the strains used in our study grew at a similar growth rate (S2 Fig). Our results indicate that some strains retain, or even increase, their ability to form biofilms after rehydration.

Staining of *A. baumannii* strains spotted on the glass by using the BacLight LIVE/DEAD bacterial viability kit demonstrated the transition from mostly viable populations (0 days, most of the cells fluoresced in green) to populations where cells with compromised cytoplasmic membranes predominated (red fluorescent cells) (Fig 3). A more precise quantification using reconstructions of confocal sections by the NIS-Elements software reveals fewer differences between live and dead bacteria at early time-points, but overall, the presence of a fraction of cells with intact cell membranes (green fluorescent cells) could be detected after 60 days. Moreover, the time required for the loss of membrane integrity differed between strains. After 20 days of desiccation, a significant proportion of the cells of the strain ATCC[®] 19606^T fluoresced in red (Fig 3 left) while most of the populations of the clinical isolates remained viable, in some cases, up to 60 days (Fig 3 (right) and S3 Fig).

We examined white lab coat fragments inoculated with bacteria by scanning electron microscopy to study the morphology of bacterial adherence on that surface. SEM revealed some cells with slightly altered cell morphology after long-term starvation and desiccation (Fig 4E and 4F) in comparison with fresh samples (Fig 4C and 4D). Bacteria seem to be firmly attached to the lab cotton fibers even after several washing steps and a series of ethanol washes during the sample processing.

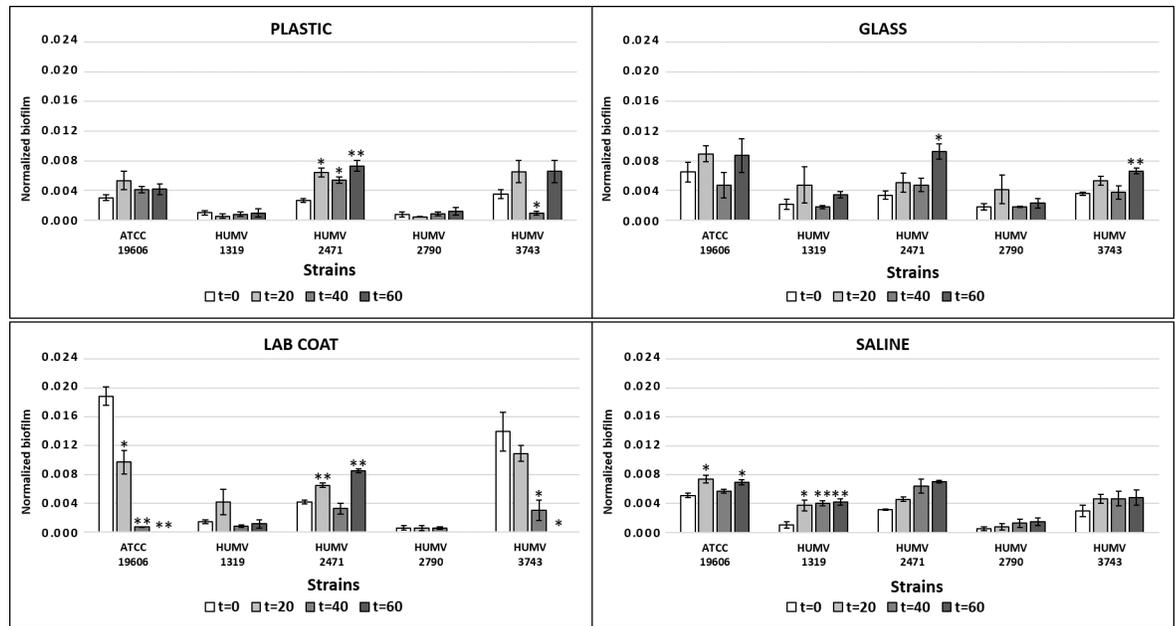


Fig 2. Quantification of biofilm formation. Biofilm formation by *A. baumannii* strains after desiccation and rehydration with LB. Quantification of biofilm formation was performed after crystal violet extraction and measurement (OD₆₂₀). Normalized biofilm formation, calculated as the total biofilm (expressed as the OD₆₂₀) divided by growth (expressed in CFUs). Time is indicated in days. Values are presented as the mean ± standard error (SE) of three independent experiments. Asterisks indicate: *, p<0.05; **, p<0.01.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201961.g002>

G. mellonella larvae were challenged with fresh inocula of two *A. baumannii* strains and compared with larvae challenged with stressed bacteria (prepared from saline suspensions) of the same strains. Survival was recorded every 12 h for up to 84 h. 10⁵ CFUs (per larvae) from strains HUMV-2790 and HUMV-1319 killed 50% of larvae after 72 h, and 50% and 70% of larvae after 84 h, respectively. Nevertheless, these strains killed more than 60% of larvae after 72 h after having suffered stress. Moreover, stressed strain HUMV-2790 killed 90% of larvae after 84 h (Fig 5).

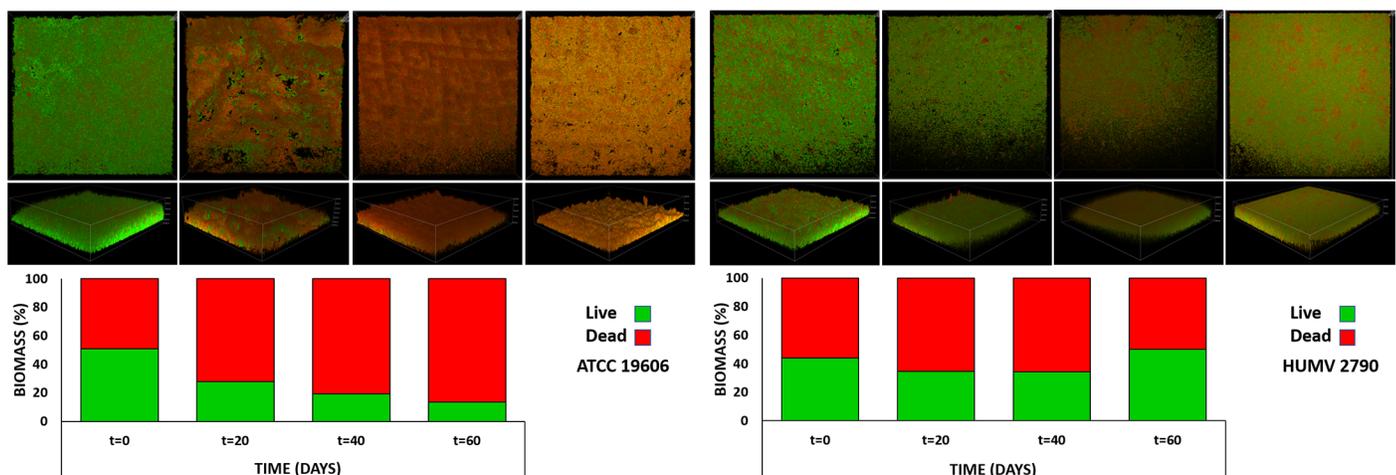


Fig 3. Confocal Laser Scanning Microscopy of live/dead cells. CLSM images of two *A. baumannii* strains after survival onto glass coverslips at different times (up to 60 days). Representative examples of strain *A. baumannii* ATCC[®] 19606^T (the worst survivor, left), and of HUMV-2790 (the best survivor, right) are shown. Bacteria were stained with the BacLight LIVE/DEAD viability kit. Live cells fluoresce in green with Syto 9 dye, and dead cells are stained red with propidium iodide. Original magnification: ×400. Lower panel: fluorescence (live/dead) for each strain represented in the upper panel, expressed as a percentage.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201961.g003>

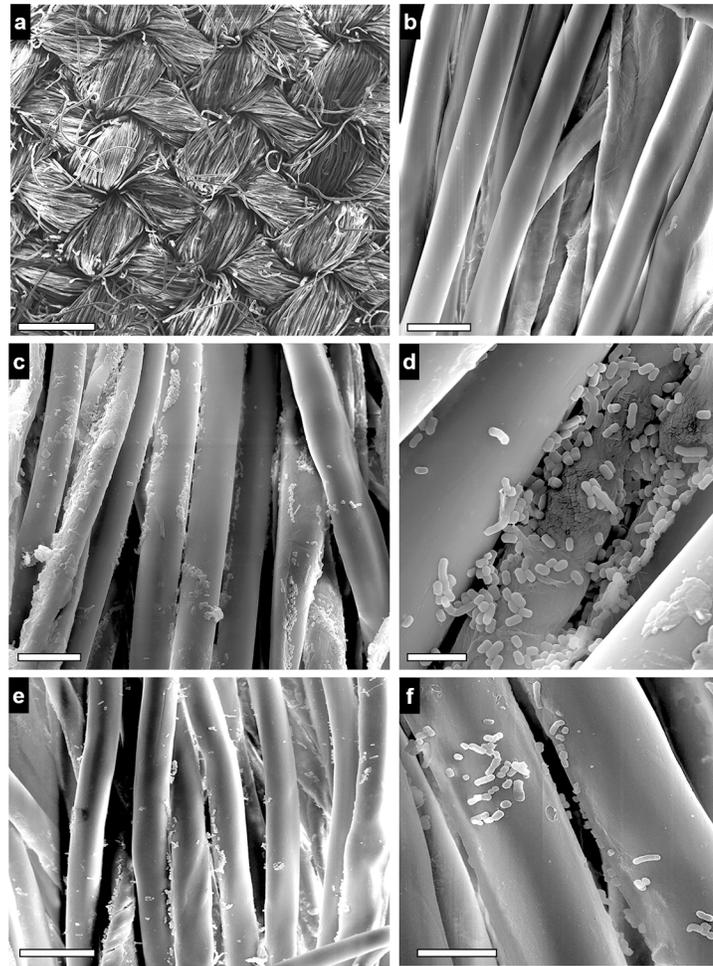


Fig 4. SEM analysis. Scanning electron microscopy analysis of the morphology of *A. baumannii* (strain ATCC[®] 19606^T) cells maintained on white lab coat fragments for up to 60 days. Panel shows random microscopy fields observed at different magnifications. a,b, control samples, and c,d, infected samples at the beginning of the experiments (day 0). e,f, infected samples after 60 days at 22°C. Original Magnification: a, $\times 100$; b,c,e, $\times 2,500$; d, $\times 10,000$; f, $\times 5,000$. Scale bars: a, 0.5 mm; b, 20 μm ; c,e, 25 μm ; d, 5 μm ; f, 10 μm .

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201961.g004>

To analyze the contribution of stress adaptation to human serum resistance or sensitivity, we tested strains HUMV-2790 and HUMV-1319 in a serum survival assay. Inocula from these strains were prepared from populations maintained in liquid environments or onto lab coat fragments and compared with fresh cultures (inoculum). Both strains were resistant to human serum when suspensions were made from LB medium. After long-term starvation, both strains were also resistant when inocula from lab coat fragments were tested. Strain HUMV 1319 shows a reduction in viability when bacteria came from saline and was resuspended in normal serum but not in inactivated serum (unpaired T-test, $p = 0.002$). Conversely, strain HUMV 2790 grows well in both normal and inactivated serum (Fig 6). As expected, *E. coli* strains were susceptible to human serum (S4 Fig).

Discussion

The survival of pathogenic microorganisms in the healthcare environment has a significant role in nosocomial infections. Patient contamination may result from healthcare workers'

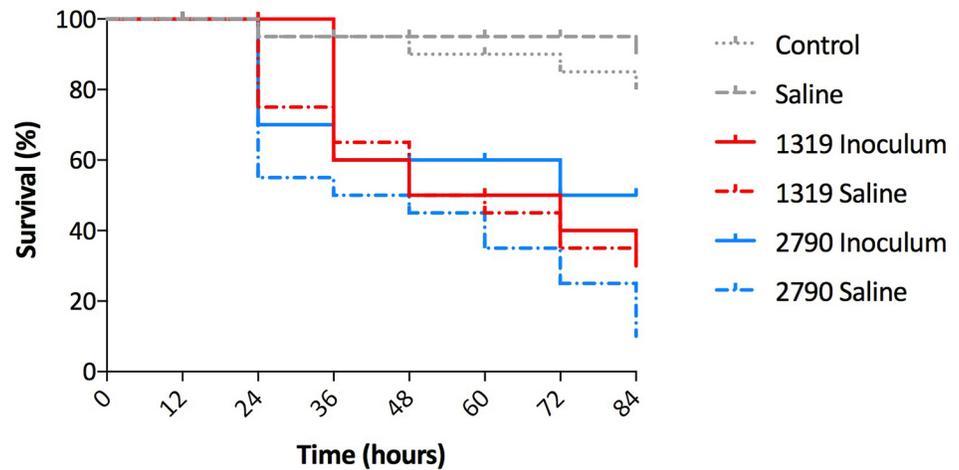


Fig 5. *Galleria mellonella* killing assays. Survival rate of worms after challenge with two *A. baumannii* strains. Ten larvae were infected with saline alone, with 10^5 CFU of each strain or uninoculated (no manipulation control), incubated at 37°C for 84 h and the time of the death of the larvae was recorded. Results are the mean of two separate experiments.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201961.g005>

hands, medical devices, or also by the direct patient shedding of bacteria, which can survive up to several months on inanimate surfaces [28]. Since different surfaces may influence the survival times, we used materials that are typical for the hospital environment to study the survival ability of *A. baumannii* strains, including white laboratory coats used by professionals in the medical field and those involved in laboratory work. According to several authors, *A.*

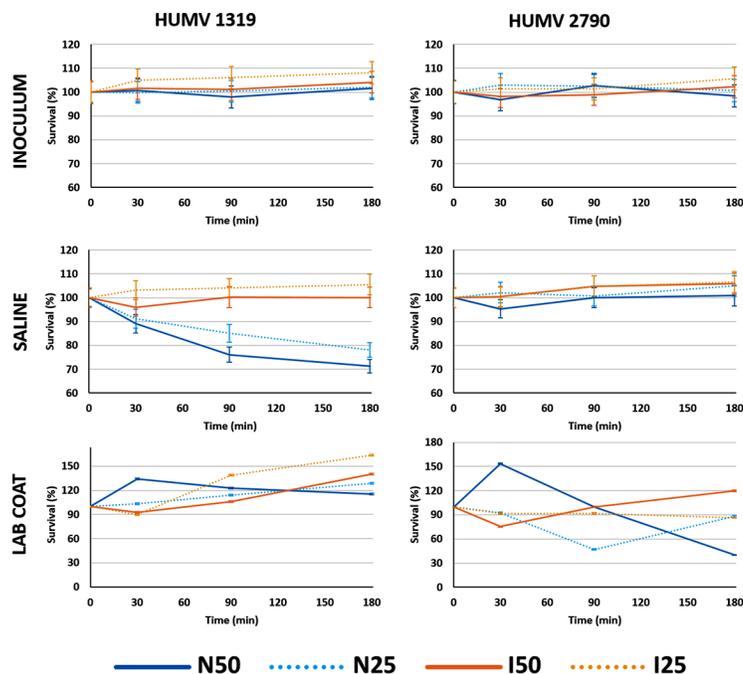


Fig 6. Effect of stress conditions on *A. baumannii* survival in human serum. Survival ability of *A. baumannii* strains from fresh cultures or different stress conditions in 50% (N50, solid lines) and 25% (N25, dotted lines) non-immune human serum (blue) or in inactivated serum (orange). Results are presented as percentage survival relative to 100% of the initial inoculum. Values shown are means of three replicates from three independent experiments.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201961.g006>

baumannii can survive desiccation, although this ability varies dramatically depending on the strains tested [18, 21, 29, 30]. Our results show that the long-term survival of *A. baumannii* on dry surfaces was only slightly affected by the material used because a constant reduction in culturability was observed onto plastic, glass, and lab coat surfaces. In general, the resistance to stressful conditions was high, being the reference strain the most susceptible to desiccation. Remarkable is the survival of all strains on the white lab coat fragments. In a recent study, Munoz-Price found concordance between contamination of hands of healthcare workers and their white lab coats [31] and their results include strains of *Acinetobacter* spp. as contaminants.

Staining of *A. baumannii* strains spotted on glass demonstrated the presence of cells with intact cell membranes after long-term starvation and desiccation. Again, reference strain ATCC[®] 19606^T was the most sensitive to these conditions. Viable but nonculturable state was not induced in *A. baumannii* under these conditions because adding sodium pyruvate to the recovery medium does not affect culturability [22, 23]. Our SEM analysis also confirmed that some strains remain attached to cotton fibers on the white lab coat fragments after long-term starvation and desiccation.

Our results correlate with those of Bravo et al. with *A. baumannii* populations starved in a liquid environment and with our previous findings using *A. pittii* strains, a less well-known species of the genus *Acinetobacter* [26].

Among the responsible mechanisms that could allow nosocomial pathogens to persist with these stress conditions are their ability to resist desiccation and to form biofilms. The ability of *A. baumannii* to form biofilms is a potential virulence factor that has received some attention. However, although adherence is a prerequisite for infection, *A. baumannii* shows low adherence to epithelial cells [24]. In this work, we used three biofilm-forming and two non-biofilm-forming strains. Importantly, biofilm-forming strains retain or even increase their capacity to form biofilms after rehydration, despite a considerable reduction in culturability over time.

A. baumannii must first evade serum bactericidal activity to establish infection. Several studies show that a significant proportion of clinical *A. baumannii* strains are resistant to killing by normal human serum [32–34]. We wanted to know if long-term starvation may reduce *A. baumannii* resistance to human serum, which could help the immune system to fight opportunistic infections. Our results show that bacteria, despite being under stress for a long time, retain their capacity to resist and even to grow in human immune serum. Interestingly, one strain seems to reduce its capacity for growth in 50% serum after being a long time on the cotton surface.

Following with virulence traits, we wanted to know if *G. mellonella* larvae can be killed by *A. baumannii* stressed cells. Testing virulence of strains from lab coat experiments would be also interesting but we have not obtained enough bacteria to perform the *Galleria* assays. Using strains maintained for 60 days under starvation (saline), when compared with their respective fresh inocula no loss of virulence was observed in the *Galleria* model. This suggests a rapid adaptation of bacteria to the temperature shift (from room temperature to 37°C) and to the availability of nutrients (from starvation to food availability), conditions that bacteria can easily find in a new patient. The data presented here contribute to a better understanding of the resilience and risk of *A. baumannii* in hospital settings.

Although more than 80 full genome sequences of *A. baumannii* have been published, very few potential virulence factors have been identified. We have recently shown that *A. baumannii* can escape from macrophages but is easily eliminated by other human immune cells [35]. This means that *Acinetobacter* could merely perform its job by resisting the serum bactericidal activity, multiplying in blood and releasing its potent stimulator of the immune response, the lipopolysaccharide.

Supporting information

S1 Fig. Biofilm formation by *A. baumannii* strains after desiccation and rehydration with LB medium. Shown are representative examples of biofilm formation in 24-well plates by the 5 *A. baumannii* strains spotted onto various surfaces after rehydration and growth in LB medium for 48 h at 37°C. Wells were stained with crystal violet.

(TIF)

S2 Fig. Growth curves of *A. baumannii* strains growing in 96-well plates in Luria broth.

Values are means of bacterial density measured at OD₆₀₀. Bars indicate mean±SD of four independent replicates.

(TIF)

S3 Fig. Confocal Laser Scanning Microscopy of live/dead cells. Representative examples of CLSM images of three *A. baumannii* strains after survival onto glass cover slips at different times (up to 60 days). Bacteria were stained with the BacLight LIVE/DEAD viability kit. Live cells fluoresce in green with Syto 9 dye and dead cells are stained red with propidium iodide. Original magnification: ×400. Lower panel: fluorescence (live/dead) for each strain represented in the upper panel, expressed as percentage.

(TIF)

S4 Fig. Effect of human serum on a susceptible bacterium. *Escherichia coli* DH10B **a**) and BL21 **b**) strains were used as positive controls for serum susceptibility in 50% non-immune human serum (blue) or in inactivated serum (orange). Results are presented as percentage survival relative to 100% of the initial inoculum. Values shown are means of three replicates from three independent experiments.

(TIF)

Acknowledgments

M.L.-D. holds a contract from the Instituto de Investigación Sanitaria Valdecilla IDIVAL and Universidad de Cantabria (PREVAL16/05). J.R.-V. holds a Miguel Servet II contract for Young Researchers from the Instituto de Salud Carlos III, Spain. The authors thank Dr. Fidel Madrazo (Electron Microscopy Unit, Technology Support Services, IDIVAL) for helping with confocal microscopy and Dr. Miguel Santibáñez for his assistance with the statistics used in this report. Research in our laboratory is supported by the Instituto de Salud Carlos III, Spain (grant PI16/01103) and the Plan Nacional de I+D+i 2008–2011 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)—co-financed by European Development Regional Fund "A way to achieve Europe" ERDF.

Author Contributions

Conceptualization: Jesús Navas, José Ramos-Vivas.

Data curation: José Ramos-Vivas.

Formal analysis: Itziar Chapartegui-González, María Lázaro-Díez, Jesús Navas, José M. Icardo, José Ramos-Vivas.

Investigation: Itziar Chapartegui-González, María Lázaro-Díez, Zaloa Bravo, José M. Icardo.

Methodology: Itziar Chapartegui-González, José M. Icardo, José Ramos-Vivas.

Resources: Jesús Navas, José Ramos-Vivas.

Supervision: José Ramos-Vivas.

Visualization: José M. Icardo, José Ramos-Vivas.

Writing – original draft: Itziar Chapartegui-González, María Lázaro-Díez, Zaloa Bravo, Jesús Navas, José Ramos-Vivas.

Writing – review & editing: José Ramos-Vivas.

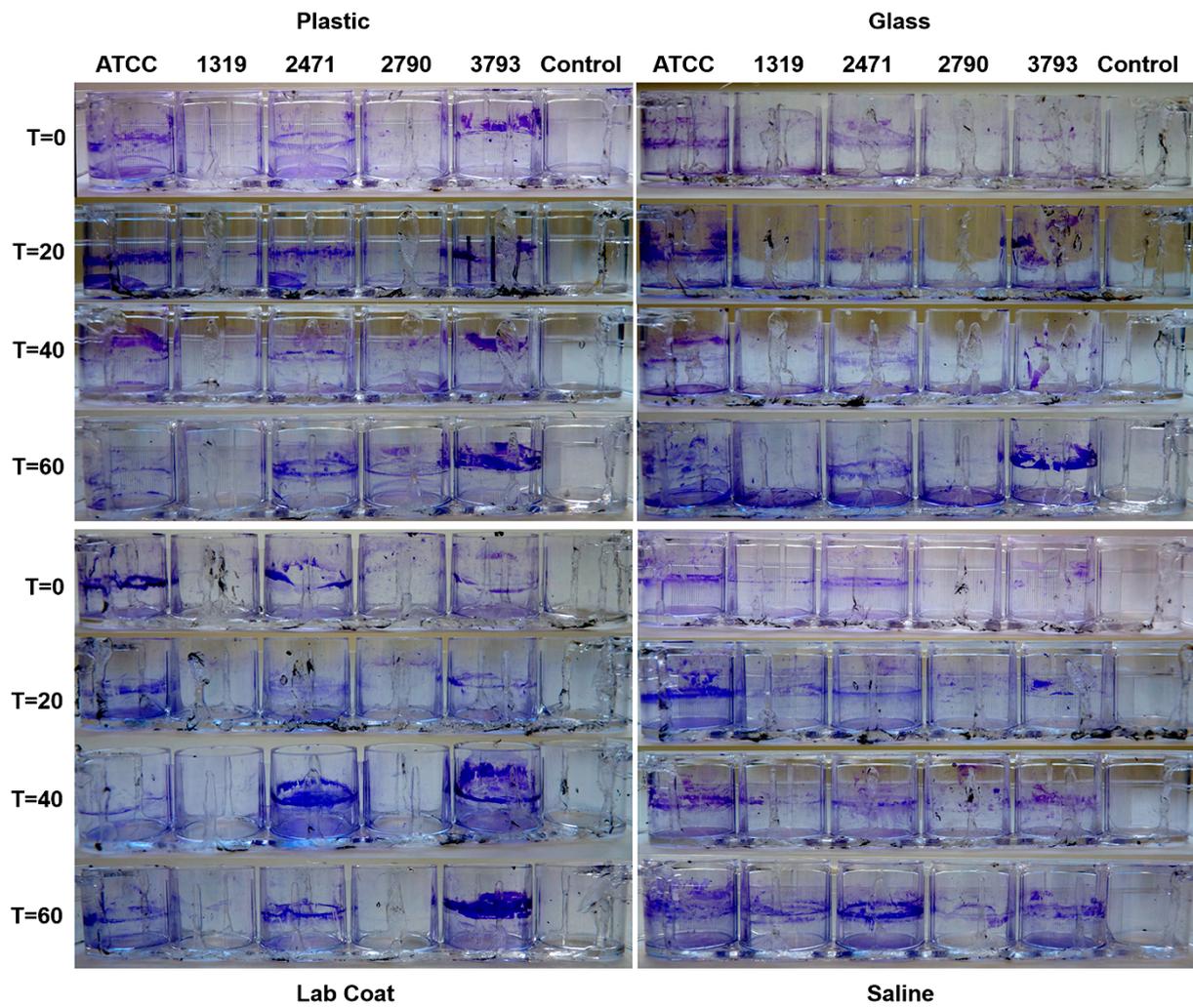
References

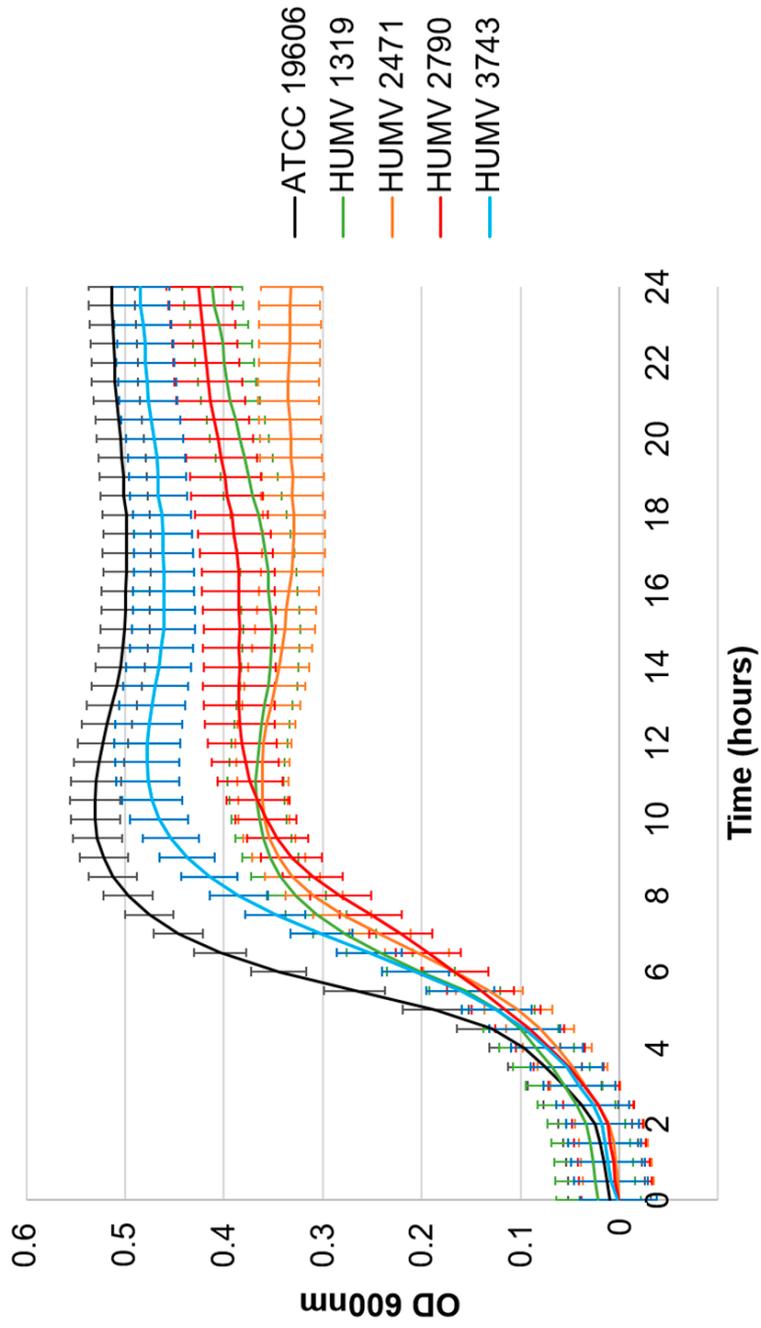
1. Roca I, Espinal P, Vila-Farres X, Vila J. The *Acinetobacter baumannii* Oxymoron: Commensal Hospital Dweller Turned Pan-Drug-Resistant Menace. *Front Microbiol.* 2012; 3:148. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00148> PMID: 22536199.
2. Harding CM, Hennon SW, Feldman MF. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. *Nat Rev Microbiol.* 2017. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.148> PMID: 29249812.
3. Choi CH, Hyun SH, Lee JY, Lee JS, Lee YS, Kim SA, et al. *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A targets the nucleus and induces cytotoxicity. *Cell Microbiol.* 2008; 10(2):309–19. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.01041.x> PMID: 17760880.
4. 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; 78(9):3993–4000. <https://doi.org/10.1128/IAI.00366-10> PMID: 20643860.
5. Vila-Farres X, Ferrer-Navarro M, Callarisa AE, Marti S, Espinal P, Gupta S, et al. Loss of LPS is involved in the virulence and resistance to colistin of colistin-resistant *Acinetobacter nosocomialis* mutants selected *in vitro*. *J Antimicrob Chemother.* 2015; 70(11):2981–6. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv244> PMID: 26311838.
6. 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). <https://doi.org/10.1128/mBio.00312-12> PMID: 23033474.
7. Wong D, Nielsen TB, Bonomo RA, Pantapalangkoor P, Luna B, Spellberg B. Clinical and Pathophysiological Overview of *Acinetobacter* Infections: a Century of Challenges. *Clinical microbiology reviews.* 2017; 30(1):409–47. <https://doi.org/10.1128/CMR.00058-16> PMID: 27974412.
8. Erridge C, Moncayo-Nieto OL, Morgan R, Young M, Poxton IR. *Acinetobacter baumannii* lipopolysaccharides are potent stimulators of human monocyte activation via Toll-like receptor 4 signalling. *J Med Microbiol.* 2007; 56(Pt 2):165–71. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46823-0> PMID: 17244795.
9. Garnacho-Montero J, Amaya-Villar R, Ferrandiz-Millon C, Diaz-Martin A, Lopez-Sanchez JM, Gutierrez-Pizarra A. Optimum treatment strategies for carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2015; 13(6):769–77. <https://doi.org/10.1586/14787210.2015.1032254> PMID: 25865094.
10. Bassetti M, Righi E. New antibiotics and antimicrobial combination therapy for the treatment of gram-negative bacterial infections. *Curr Opin Crit Care.* 2015; 21(5):402–11. <https://doi.org/10.1097/MCC.0000000000000235> PMID: 26263298.
11. Saun TJ, Rogers AD, Leis JA, Cartotto R. The Use of Intravenous and Inhaled Colistin Therapy During a Burn Center Outbreak of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Burn Care Res.* 2017. <https://doi.org/10.1097/BCR.0000000000000626> PMID: 28877134.
12. Shamsizadeh Z, Nikaeen M, Nasr Esfahani B, Mirhoseini SH, Hatamzadeh M, Hassanzadeh A. Detection of antibiotic resistant *Acinetobacter baumannii* in various hospital environments: potential sources for transmission of *Acinetobacter* infections. *Environ Health Prev Med.* 2017; 22(1):44. <https://doi.org/10.1186/s12199-017-0653-4> PMID: 29165152.
13. Shimose LA, Masuda E, Sfeir M, Berbel Caban A, Bueno MX, dePascale D, et al. Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*: Concomitant Contamination of Air and Environmental Surfaces. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2016; 37(7):777–81. <https://doi.org/10.1017/ice.2016.69> PMID: 27045768.
14. Weber DJ, Anderson D, Rutala WA. The role of the surface environment in healthcare-associated infections. *Curr Opin Infect Dis.* 2013; 26(4):338–44. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e3283630f04> PMID: 23743816.
15. Russotto V, Cortegiani A, Raineri SM, Giarratano A. Bacterial contamination of inanimate surfaces and equipment in the intensive care unit. *J Intensive Care.* 2015; 3:54. <https://doi.org/10.1186/s40560-015-0120-5> PMID: 26693023.

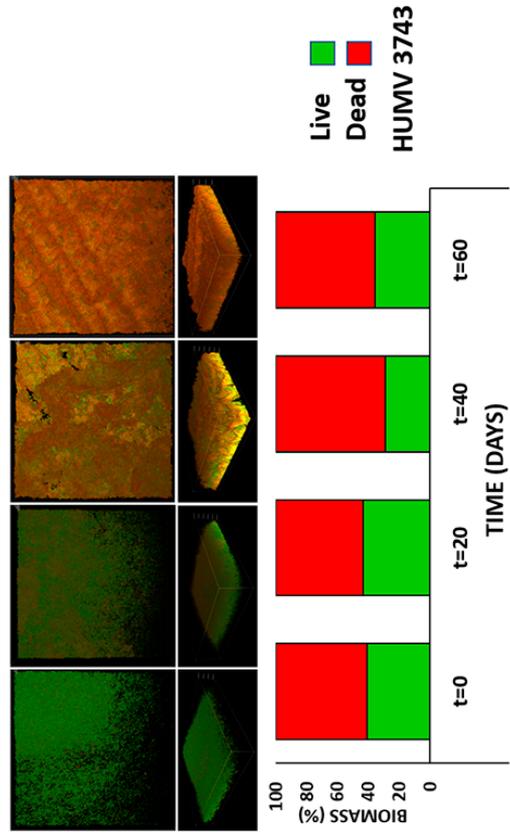
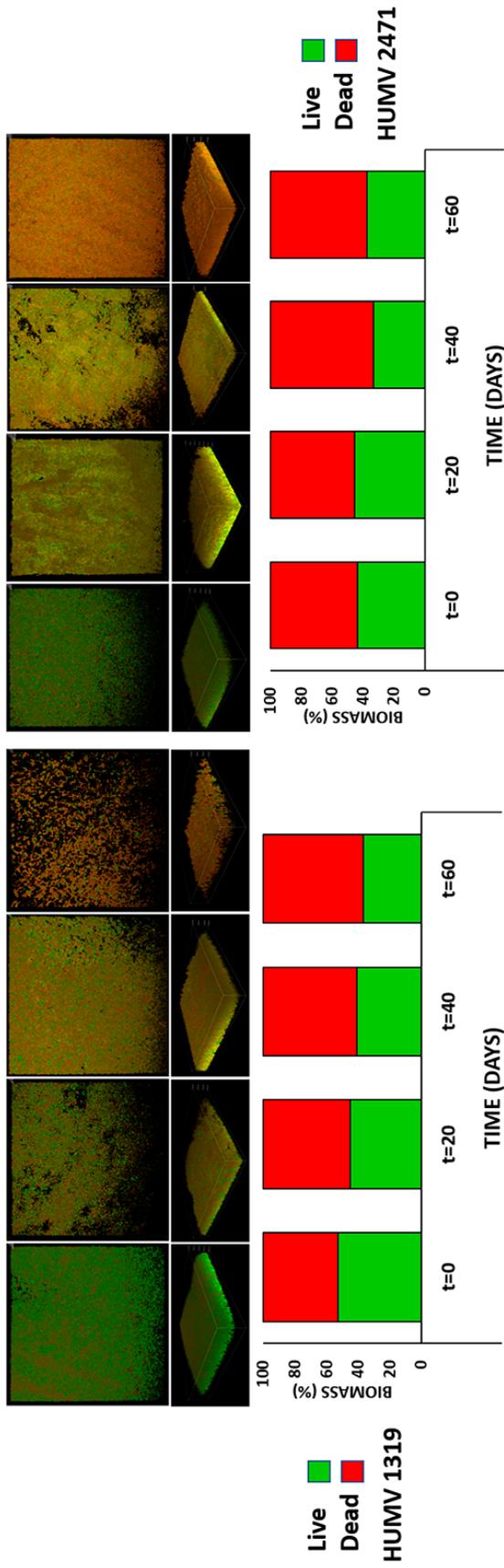
16. D'Agata EM, Venkataraman L, DeGirolami P, Samore M. Molecular epidemiology of ceftazidime-resistant gram-negative bacilli on inanimate surfaces and their role in cross-transmission during nonoutbreak periods. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(9):3065–7. PMID: [10449510](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10449510/).
17. Boyce JM. Environmental contamination makes an important contribution to hospital infection. *J Hosp Infect.* 2007; 65 Suppl 2:50–4. [https://doi.org/10.1016/S0195-6701\(07\)60015-2](https://doi.org/10.1016/S0195-6701(07)60015-2) PMID: [17540242](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17540242/).
18. Jawad A, Seifert H, Snelling AM, Heritage J, Hawkey PM. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. *J Clin Microbiol.* 1998; 36(7):1938–41. PMID: [9650940](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9650940/).
19. Jawad A, Snelling AM, Heritage J, Hawkey PM. Exceptional desiccation tolerance of *Acinetobacter radioresistens*. *The Journal of hospital infection.* 1998; 39(3):235–40. PMID: [9699144](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9699144/).
20. Jawad A, Heritage J, Snelling AM, Gascoyne-Binzi DM, Hawkey PM. Influence of relative humidity and suspending menstrua on survival of *Acinetobacter* spp. on dry surfaces. *J Clin Microbiol.* 1996; 34(12):2881–7. PMID: [8940416](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8940416/).
21. Espinal P, Marti S, Vila J. Effect of biofilm formation on the survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *J Hosp Infect.* 2012; 80(1):56–60. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2011.08.013> PMID: [21975219](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21975219/).
22. Oliver JD. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS microbiology reviews.* 2010; 34(4):415–25. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00200.x> PMID: [20059548](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20059548/).
23. Vivas J, Carracedo B, Riano J, Razquin BE, Lopez-Fierro P, Acosta F, et al. Behavior of an *Aeromonas hydrophila* aroA live vaccine in water microcosms. *Applied and environmental microbiology.* 2004; 70(5):2702–8. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.5.2702-2708.2004> PMID: [15128521](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15128521/).
24. Lazaro-Diez M, Navascues-Lejarza T, Remuzgo-Martinez S, Navas J, Icardo JM, Acosta F, et al. *Acinetobacter baumannii* and *A. pittii* clinical isolates lack adherence and cytotoxicity to lung epithelial cells in vitro. *Microbes Infect.* 2016; 18(9):559–64. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.05.002> PMID: [27235198](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27235198/).
25. Remuzgo-Martinez S, Lazaro-Diez M, Mayer C, Aranzamendi-Zaldumbide M, Padilla D, Calvo J, et al. Biofilm Formation and Quorum-Sensing-Molecule Production by Clinical Isolates of *Serratia liquefaciens*. *Appl Environ Microbiol.* 2015; 81(10):3306–15. <https://doi.org/10.1128/AEM.00088-15> PMID: [25746999](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25746999/).
26. Bravo Z, Chapartegui-Gonzalez I, Lazaro-Diez M, Ramos-Vivas J. *Acinetobacter pittii* biofilm formation on inanimate surfaces after long-term desiccation. *J Hosp Infect.* 2018; 98(1):74–82. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2017.07.031> PMID: [28764931](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28764931/).
27. Peleg AY, Jara S, Monga D, Eliopoulos GM, Moellering RC Jr., Mylonakis E. *Galleria mellonella* as a model system to study *Acinetobacter baumannii* pathogenesis and therapeutics. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(6):2605–9. <https://doi.org/10.1128/AAC.01533-08> PMID: [19332683](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19332683/).
28. Dancer SJ. Controlling hospital-acquired infection: focus on the role of the environment and new technologies for decontamination. *Clinical microbiology reviews.* 2014; 27(4):665–90. <https://doi.org/10.1128/CMR.00020-14> PMID: [25278571](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25278571/).
29. Wendt C, Dietze B, Dietz E, Ruden H. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *J Clin Microbiol.* 1997; 35(6):1394–7. PMID: [9163451](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9163451/).
30. Bravo Z, Orruno M, Parada C, Kaberdin VR, Barcina I, Arana I. The long-term survival of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606(T) under nutrient-deprived conditions does not require the entry into the viable but non-culturable state. *Arch Microbiol.* 2016; 198(5):399–407. <https://doi.org/10.1007/s00203-016-1200-1> PMID: [26872882](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26872882/).
31. Munoz-Price LS, Arheart KL, Mills JP, Cleary T, Depascale D, Jimenez A, et al. Associations between bacterial contamination of health care workers' hands and contamination of white coats and scrubs. *Am J Infect Control.* 2012; 40(9):e245–8. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2012.03.032> PMID: [22998784](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22998784/).
32. Rosales-Reyes R, Gayosso-Vazquez C, Fernandez-Vazquez JL, Jarillo-Quijada MD, Rivera-Benitez C, Santos-Preciado JI, et al. Virulence profiles and innate immune responses against highly lethal, multidrug-resistant nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii* from a tertiary care hospital in Mexico. *PLoS One.* 2017; 12(8):e0182899. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182899> PMID: [28797068](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28797068/).
33. Sanchez-Larrayoz AF, Elhosseiny NM, Chevrette MG, Fu Y, Giunta P, Spallanzani RG, et al. Complexity of Complement Resistance Factors Expressed by *Acinetobacter baumannii* Needed for Survival in Human Serum. *J Immunol.* 2017; 199(8):2803–14. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700877> PMID: [28855313](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28855313/).
34. 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.* 2015; 1(1). <https://doi.org/10.1128/mSphere.00013-15> PMID: [27303682](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27303682/).

35. Lazaro-Diez M, Chapartegui-Gonzalez I, Redondo-Salvo S, Leigh C, Merino D, Segundo DS, et al. Human neutrophils phagocytose and kill *Acinetobacter baumannii* and *A. pittii*. *Sci Rep*. 2017; 7 (1):4571. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04870-8> PMID: 28676640.

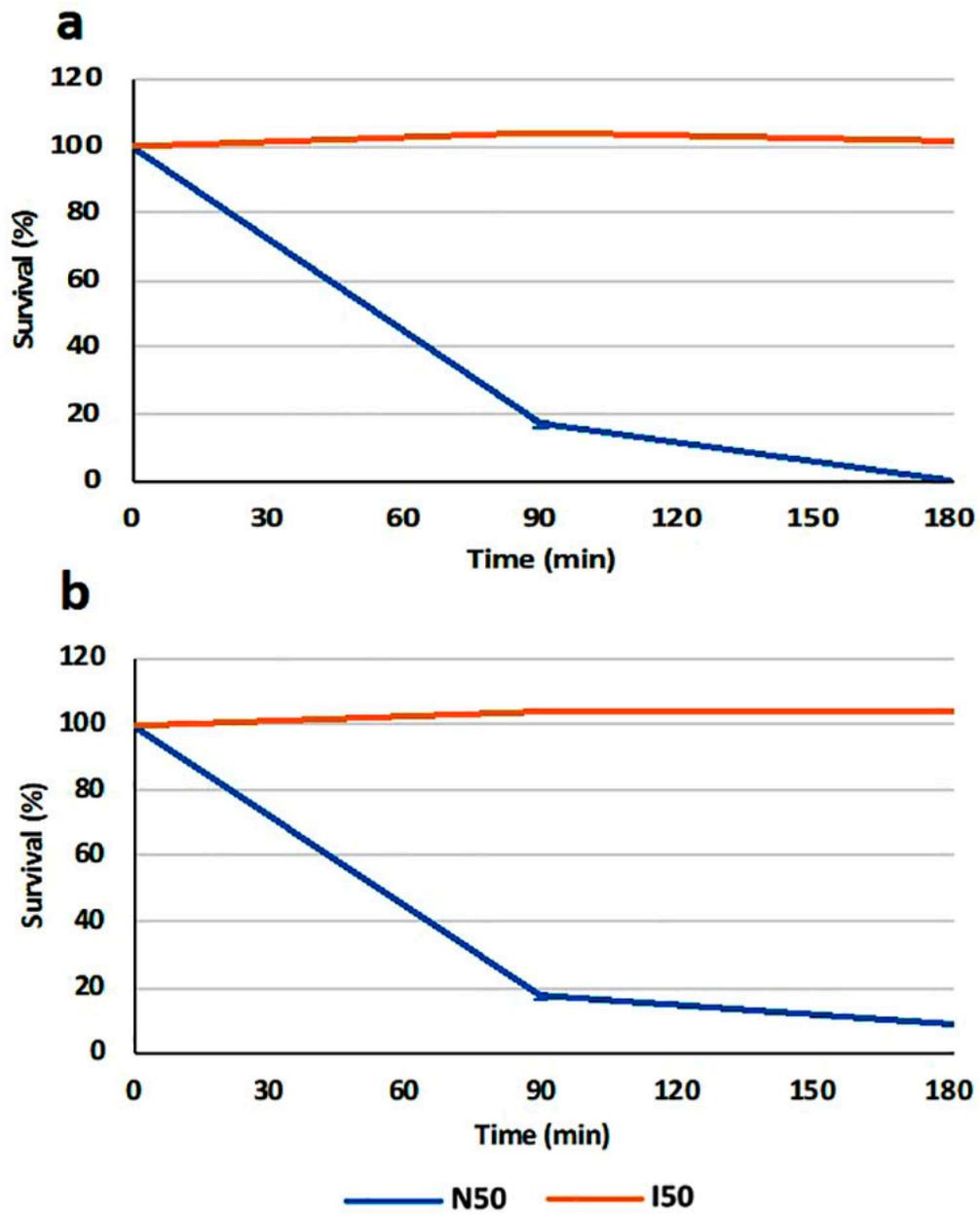
S1







S4



**Whole-Genome Sequence of *Acinetobacter baumannii* HUMV-3743
isolated from an human wound exudate**

Itziar Chapartegui-González^{1,2,6#}, María Lázaro-Díez^{1,2,3}, Santiago Redondo-Salvo⁴,
Javier Gonzalo Ocejo-Vinyals⁵, Jesús Navas-Méndez^{3,6}, and José Ramos-Vivas^{1,2,3#}

¹Instituto de Investigación Valdecilla IDIVAL, Santander, 39011, Spain

²Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, 39008, Spain

³Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, 28029, Spain

⁴Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBTEC), Universidad de Cantabria, Santander, 39011, Spain

⁵Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, 39008, Spain

⁶Departamento de Biología Molecular, Universidad de Cantabria, Santander, 39011, Spain

Corresponding author. Tel.: +34 942 315515-Ext 74119;

E-mail address: ichapg00@gmail.com / jvivas@idival.org

Abstract

Acinetobacter baumannii strain HUMV-3743 was obtained from wound exudate from an adult patient. Here, we report its complete genome sequence using the Illumina-based sequence analysis, which revealed a genome of 4,066,761 bp, in a chromosome with approximately 3.89 Mb and 2 predicted plasmids (78.9 and 107 kb). 3,881 protein-coding genes are predicted from this assembly.

Keywords

Acinetobacter baumannii, MDR, antimicrobials

Acinetobacter species are inherently resistant to several antibiotics or capable of readily acquiring resistance. Clinical isolates are able to rapidly spread among patients and survive in the hospital environment (1, 2). *Acinetobacter baumannii* has been extensively studied because it has been associated with a high mortality rate and has emerged as one of the most problematic nosocomial pathogens (3). Like other Gram negative bacilli, *A. baumannii* has a great ability to acquire a multidrug-resistant (MDR) phenotype. For this reason, in 2017, The World Health Organization (WHO) published a list for MDR and XDR (extensively drug-resistant) bacteria, for which new antibiotics are urgently needed, carbapenem resistant *A. baumannii* (CRAB) being the first in critical priority (4).

The strain used in this study (HUMV-3743) was isolated in Blood agar from the wound exudate of an adult at the Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV), in Santander, Spain. The strain was routinely cultured in Blood agar, Luria agar or Luria broth at 37°C, and frozen at -80°C with 20% glycerol.

The total genomic sample of *A. baumannii* strain HUMV-3743 was extracted and purified using the GeneJET Genomic DNA isolation kit (Thermo Scientific) after growth on Luria broth for 24 h at 37°C. The genomic DNA was submitted to Fisabio (Fundació per al Foment de la Investigació Sanitària i Biomèdica, Spain) for Illumina (MiSeq 2x300) sequencing.

The whole-genome sequence was assembled using Unicycler v0.3.0.b (5), resulting in 176 contigs with a total size of 4,066,761 bp, a GC content of 39.0%, an N_{50} value of 111,502 bp and an L_{50} value of 12. A chromosome with 3.89 Mb and two probable plasmids with approximately 107 kb and 78.9 kb were predicted with PLACNETw server (6).

Annotation of the genome sequence using the Rapid Annotation using Subsystems Technology (RAST) server (7), identified 3,881 coding sequences and 66 RNAs (63 tRNA genes and 1 mRNA genes with ARAGORN software (8) and 2 rRNA with RNAmmer software (9)). Using RAST, 456 subsystems were predicted, including 314 involved in carbohydrate metabolism, 225 in protein metabolism, 445 in the synthesis of amino acids and derivatives, 123 in cell wall and capsule synthesis, 128 in RNA metabolism, and 87 in DNA metabolism, including 256 in cofactors, vitamins,

prosthetic groups or pigments, 99 in nucleoside and nucleotide synthesis, 178 in fatty acid and lipid synthesis, 71 involved in virulence, 108 in membrane transport, 40 in phosphorus metabolism, 85 in regulation and cell signaling, 5 in secondary metabolism, 40 in phages, prophages, transposable elements and plasmids, 117 in stress response and 2 in dormancy and sporulation.

Gene clusters related to siderophores (actinoferrin), arylpolyene and others (10) were detected using antiSMASH bacterial version. A preliminary analysis using Prokka 1.13 (11) and ABRicate 0.8 software (<https://www.github.com/tseemann/abricate>) as well as CARD (12) identified the following antimicrobial resistance genes: *ant(3'')-IIa*, *aph(6)-Id*, *aph(3')-VIa*, *aph(3'')-Ib* (also named *strA*) and *aac(3)-IIa* related with aminoglycoside resistance; *ampC*, *bla_{OXA-109}* and *bla_{ADC-25}* related with β -lactam resistance; *tetA* related with tetracycline resistance; and *catB4* related with chloramphenicol resistance. This analysis also revealed a broad repertoire of efflux pumps genes (*adeABC*, *adeFGH*, *adeIJK*, *abeS*, *abeM* among others), most of which are associated with antimicrobial resistance too.

Nucleotide sequence accession number. This Whole Genome Shotgun project has been deposited at DDBJ/ENA/GenBank under the accession RRCI00000000 and BioProject accession PRJNA507520. The version described in this paper is version RRCI01000000.

REFERENCES

1. Dijkshoorn L, Nemeč A, Seifert H. 2007. An increasing threat in hospitals: Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol* 5:939–951.
2. Chapartegui-González I, Lázaro-Díez M, Bravo Z, Navas J, Icardo JM, Ramos-Vivas J. 2018. *Acinetobacter baumannii* maintains its virulence after long-time starvation. *PLoS One* 13.
3. Roca I, Espinal P, Vila-Fanés X, Vila J. 2012. The *Acinetobacter baumannii* oxymoron: Commensal hospital dweller turned pan-drug-resistant menace. *Front Microbiol* 3:1–30.
4. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, Pulcini C. 2017. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect*

Dis 18:318–27.

5. Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. 2017. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput Biol* 13:1–22.
6. Toro MDE, Garcillán-barca MP, Cruz FDEL a. 2014. Plasmid Diversity and Adaptation Analyzed by Massive Sequencing of *Escherichia coli* Plasmids. *Microbiol Spectr* 2:1–16.
7. Aziz RK, Bartels D, Best A, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma 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* 9:1–15.
8. Laslett D, Canback B. 2004. ARAGORN, a program to detect tRNA genes and tmRNA genes in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Res* 32:11–16.
9. Lagesen K, Hallin P, Rodland EA, Staerfeldt H-H, Rognes T, Ussery DW. 2007. RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. *Nucleic Acids Res* 35:3100–3108.
10. Weber T, Blin K, Duddela S, Krug D, Kim HU, Bruccoleri R, Lee SY, Fischbach MA, Müller R, Wohlleben W, Breitling R, Takano E, Medema MH. 2015. AntiSMASH 3.0-A comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Res* 43:W237–W243.
11. Seemann T. 2014. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30:2068–2069.
12. McArthur AG, Waglechner N, Nizam F, Yan A, Azad MA, Baylay AJ, Bhullar K, Canova MJ, De Pascale G, Ejim L, Kalan L, King AM, Koteva K, Morar M, Mulvey MR, O'Brien JS, Pawlowski AC, Piddock LJV, Spanogiannopoulos P, Sutherland AD, Tang I, Taylor PL, Thaker M, Wang W, Yan M, Yu T, Wright GD. 2013. The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrob Agents Chemother* 57:3348–3357.

