



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

# **Grado en Biología**

## **Área de Microbiología**

### **Memoria del Trabajo de Fin de Grado**

**Estudio de factores de virulencia del  
microorganismo patógeno nosocomial  
*Acinetobacter baumannii*.**

**Estudo de factores de virulencia do  
microorganismo patóxico nosocomial  
*Acinetobacter baumannii*.**

**Study of virulence factors of the nosocomial pathogen  
*Acinetobacter baumannii*.**

*Autora:*

**Sandra Villaverde Arosa**

*Dirigido por:*

**Dra. Margarita Poza Domínguez**

*Julio del 2019.*



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

**Facultad de ciencias**  
**Departamento de Biología**  
**Área de Microbiología**

**Trabajo de fin de grado**

Dña. Margarita Poza Domínguez, Investigadora del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña y profesora asociada de Universidad del Departamento de Biología de la Universidad de A Coruña,

Informa,

Que el presente Trabajo de Fin de Grado presentado por Sandra Villaverde Arosa y con título “Estudio de los factores de virulencia del patógeno nosocomial *A.baumannii*” ha sido realizado bajo su dirección en el Hospital Universitario de A Coruña (CHUAC) y, autoriza su envío y defensa ante el tribunal calificador.

En A Coruña, a 17 de julio de 2019

Fdo. Margarita Poza Domínguez

## **Agradecimientos**

Me gustaría empezar a dar las gracias a todas las personas que me acompañaron durante esta etapa.

A mis padres, por su apoyo incondicional. A mis abuelos, por su cariño y ánimos constantes y a Laura, mi hermana, por los quebraderos de cabeza.

A Marga, mi directora, por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo y poner su valioso tiempo a mi disposición. También a los compañer@s del laboratorio, por haberme acogido como una más y en especial a Kelly, a la que le doy mil gracias por su paciencia, atención y sobre todo por estar ahí en todo momento.

A Rodrigo, por aconsejarme, aguantarme y siempre confiar en mí.

Y por último, y no por eso menos importante, a mi amiga Isa, que me acompañó desde el principio consiguiendo con su alegría hacerme sentir como en casa.

## ÍNDICE

<b>Resumen/Resumo/Abstract</b> .....	1
<b>Introducción</b> .....	3
El patógeno nosocomial <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	3
Importancia clínica y epidemiológica .....	5
Mecanismos de resistencia y virulencia en <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	5
Sistemas de captación de hierro en <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	6
<b>Objetivo</b> .....	8
<b>Material y métodos</b> .....	8
Cepas bacterianas .....	8
Oligonucleótidos.....	8
Obtención de células competentes .....	9
Construcción del mutante .....	9
Extracción de plásmido .....	11
<b>Resultados</b> .....	11
<b>Discusión</b> .....	16
<b>Conclusión/Conclusión/Conclusion</b> .....	18
<b>Bibliografía</b> .....	18

## RESUMEN

Actualmente la resistencia bacteriana a los antibióticos supone un importante problema para la salud pública. En este ámbito el patógeno nosocomial *A. baumannii* representa uno de los organismos de mayor importancia clínica, causante de una gran cantidad de infecciones hospitalarias. Suele afectar en su mayoría a pacientes inmunodeprimidos, en los que encuentra un medio restringido en hierro. Este elemento es esencial para el crecimiento bacteriano, y por tanto, determina su capacidad de infección. *A.baumannii* ha conseguido hacer frente a esta circunstancia expresando diversos factores de virulencia, como el sistema de captación de hierro mediado por la acinetobactina, la cual es indispensable para su persistencia y capacidad de causar citotoxicidad. Además de los genes que forman el cluster de la acinetobactina, implicados en su síntesis y transporte, el genoma de *A.baumannii* cuenta con genes ubicados fuera del cluster homólogos a éstos, entre los que está el gen AS1\_2579 (homólogo a *entA*). Se cree que *entA* es de vital importancia para la síntesis del precursor de la acinetobactina, el 2,3-ácido dihidroxibenzoico, por lo que está relacionado directamente con la virulencia de la bacteria. La elaboración de cepas mutantes de los genes del cluster en *A. baumannii* ATCC 17978 reflejaron la importancia que tienen en la capacidad de infección de esta cepa, por lo que, de igual manera, mutantes de los genes homólogos a éstos (fuera del cluster) pueden servir para el diseño de futuras dianas terapéuticas.

Palabras clave: *Acinetobacter baumannii*, factor de virulencia, Acinetobactina, *entA*, mutante, AS1\_2579.

## RESUMO

Actualmente, a resistencia bacteriana aos antibióticos é un problema importante para a saúde pública. Nesta área, o patóxeno nosocomial *A. baumannii* representa un dos organismos de maior importancia clínica, causando un gran número de infeccións hospitalarias. Afecta principalmente a pacientes inmunodeprimidos, nos que atopa un medio restrinxido en ferro. Este elemento é esencial para o crecemento bacteriano e, polo tanto, determina a súa capacidade de infección. *A.baumannii* conseguiu facer fronte a esta circunstancia expresando varios factores de virulencia, como o sistema de captación de ferro mediado pola acinetobactina, que é esencial para a súa persistencia e capacidade de causar citotoxicidade. Ademais dos xenes que forman o cluster de acinetobactina, implicados na súa síntese e transporte, o xenoma de *A.baumannii* ten xenes situados fóra do clúster homólogos a estes, entre os cales está o xen AS1\_2579 (homólogo a *entA*). Crese que *entA* é de vital importancia para a síntese do precursor da

acinetobactina, ácido 2,3-dihidroxibenzoico, polo que está directamente relacionada coa virulencia da bacteria. A elaboración de cepas mutantes dos xenes do clúster en *A. baumannii* ATCC 17978 reflectiron a importancia que teñen na capacidade de infección desta cepa, polo que, do mesmo xeito, mutantes dos xenes homólogos a eles (fóra do cluster) tamén poden servir para o deseño de futuras dianas terapéuticas.

Palabras clave: *Acinetobacter baumannii*, factor de virulencia, Acinetobactina, *entA*, mutante, AS1\_2579.

## **ABSTRACT**

Currently, bacterial resistance to antibiotics is a major problem for public health. In this area, the nosocomial pathogen *A. baumannii* represents one of the most clinically important organisms, causing a large number of hospital infections. It mostly affects immunosuppressed patients, in whom it finds a medium restricted in iron. This element is essential for bacterial growth, and therefore, determines its capacity for infection. *A.baumannii* has managed to cope with this circumstance by expressing various virulence factors, such as the iron uptake system mediated by acinetobactin, which is essential for its persistence and ability to cause cytotoxicity. In addition to the genes that make up the cluster of acinetobactin, involved in its synthesis and transport, the genome of *A.baumannii* has genes located outside the cluster homologous to these, among which is the gene AS1\_2579 (homologue to *entA*). It is believed that *entA* is of vital importance for the synthesis of the precursor of acinetobactin, 2,3-dihydroxybenzoic acid, so it is directly related to the virulence of the bacteria. The elaboration of mutant strains of the genes of the cluster in *A. baumannii* ATCC 17978 reflected the importance they have in the infectious capacity of this strain, therefore, in the same way, mutants of the genes homologous to them (outside the cluster) they can serve for the design of future therapeutic targets.

Key words: *Acinetobacter baumannii*, virulence factor, Acinetobactin, *entA*, mutant, AS1\_2579.

## INTRODUCCIÓN

### EL PATÓGENO NOCOSOMIAL *Acinetobacter baumannii*

El incremento de la resistencia bacteriana a los antibióticos representa uno de los problemas más alarmantes para la salud pública, resultando en altas tasas de morbilidad y mortalidad (Torres, 2012). Ya desde mediados de los 90, profesionales del ámbito sanitario han alertado de las posibles y graves consecuencias de la incapacidad del control y tratamiento de las infecciones bacterianas debido a su resistencia. Además, desde el año 2001, la Organización mundial de la Salud (OMS) destaca la necesidad de abordar este emergente fenómeno.

La tolerancia a los antibióticos en bacterias de interés clínico refleja su gran evolución biológica. Han ido sufriendo cambios en sus fenotipos de resistencia, dando lugar a la situación actual, en el que existen importantes problemas terapéuticos a la hora de luchar contra algunas cepas bacterianas tales como *Acinetobacter*, que es resistente a la mayoría de los antibióticos disponibles (Pulcini *et al.*, 2012).

Las bacterias del género *Acinetobacter* son bacilos o cocobacilos Gram-negativos, aerobios estrictos, inmóviles, no fermentadores de glucosa, catalasa positivos y oxidasa negativos. Crecen en todos los medios de cultivo rutinarios y su temperatura de crecimiento óptima está entre 33 y 35 °C (Marcos, 1993). En medio sólido suele formar colonias lisas (a veces mucoides), convexas, de borde entero y blanco-grisáceo.

En lo que respecta a la taxonomía, las especies que pertenecen a este género han sufrido muchos cambios (Salazar de Vegasa et Nieves, 2005). A día de hoy la clasificación se establece de la siguiente forma según (Almasaudi, 2016);

Dominio: bacteria.

Filo: proteobacteria.

Clase: Gammaproteobacterias.

Orden: Pseudomonadales.

Familia: Moraxellaceae.

Género: *Acinetobacter*.

Actualmente, dentro del género *Acinetobacter*, se incluyen las especies: *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. pittii* (antiguamente conocida como *Acinetobacter* especie genómica 3), *A. nosocomialis* (antiguamente conocida como *Acinetobacter* especie genómica 13 TU), *A. seifertii* y *A. dijkschoorniae*. Estas especies están altamente relacionadas entre sí y es difícil distinguir las a nivel fenotípico, por lo que se ha propuesto incluirlas dentro del denominado complejo *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* (ACB). Este grupo representa a las cepas de *Acinetobacter* que frecuentemente están relacionadas con infecciones humanas y brotes hospitalarios, aunque también incluye a la especie típicamente ambiental *A. calcoaceticus* (Peleg *et al.*, 2008).

Dentro del género *Acinetobacter*, *A. baumannii* representa la especie de mayor importancia clínica responsable de gran cantidad de infecciones nosocomiales. Es uno de los patógenos oportunistas que más infecciones intrahospitalarias causa, destacando sobre todo por su gran capacidad de resistencia a los antibióticos y por conseguir sobrevivir y persistir en el ambiente hospitalario (Álvarez-Fraga *et al.*, 2018).

Hasta hace pocos años, *A. baumannii* estaba considerado como un patógeno de poca importancia, presente de forma normal en la microbiota de la piel, tracto intestinal y aparato respiratorio superior. Sin embargo, a día de hoy, la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (IDSA) lo ha considerado como uno de los microorganismos más peligrosos en los hospitales de todo el mundo (Towner, 2009). Junto con *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile*, *Pseudomonas aeruginosa* y la familia *Enterobacteriaceae*, conforma el grupo ESKAPE, término acuñado para designar bacterias causantes de la mayoría de las infecciones nosocomiales con habilidad para resistir el efecto de los antibióticos (Boucher *et al.*, 2009).

Recientemente, en febrero de 2017, la OMS publicó una lista de los patógenos resistentes a antibióticos, en la que se recogen 3 categorías, con el fin de ayudar a priorizar la investigación y desarrollo de tratamientos nuevos y efectivos. *A. baumannii* se encuentra en la categoría de prioridad crítica (máxima prioridad) junto con *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacterias*.



## IMPORTANCIA CLÍNICA Y EPIDEMIOLOGÍA de *Acinetobacter baumannii*

Cada vez son más habituales las infecciones y brotes nosocomiales producidos por *Acinetobacter baumannii* que afectan en especial a pacientes inmunodeprimidos o a aquellos que se encuentran en las unidades de cuidados intensivos (UCI) y de quemados, donde el uso masivo de antibióticos de amplio espectro propicia la aparición de cepas multirresistentes (Lortholary, 1995).

Las manifestaciones clínicas más frecuentes son la neumonía asociada a ventilación mecánica y las bacteriemias primarias, las cuales cuentan con alta tasa de mortalidad. También las meningitis, sepsis, infecciones de la piel y partes blandas, infecciones de heridas y, en menor medida, infecciones del tracto urinario (Hernández *et al.*, 2010).

La infección producida por *A. baumannii* puede tener lugar de diferentes maneras:

- Transmisión a partir de un paciente colonizado a través del aire (gotitas de agua a distancias cortas) o por la descamación de la piel.
- A través del contacto con personal sanitario.
- A través de equipamiento médico colonizado por *A. baumannii* (Hernández, *et al.*, 2010).

## MECANISMOS DE RESISTENCIA Y VIRULENCIA EN *Acinetobacter baumannii*

Este patógeno cuenta con elevada plasticidad genética, pudiendo así desarrollar mecanismos de resistencia a gran velocidad, lo que favorece la aparición de cepas multirresistentes a diversas clases de antibióticos (Giamarellou *et al.*, 2008).

Entre los factores que favorecen la multirresistencia se encuentran:

- la capacidad de persistir en el medio así como en el cuerpo humano, lo que facilita la transferencia de material genético entre microorganismos.
- la capacidad de adquirir elementos genéticos móviles, como plásmidos, integrones o transposones.
- la baja permeabilidad de la membrana a determinados antibióticos o la expresión de bombas de expulsión (Vila *et al.*, 2007).

Al observarse un aumento progresivo de la frecuencia de infección por *A. baumannii*, han comenzado a estudiarse los factores de virulencia implicados en la patogénesis de esta especie tales como su capacidad de formar biofilm, de adherirse, de colonizar o de invadir superficies, tanto inertes como bióticas (Cerqueira et Peleg, 2011).

Los principales factores de virulencia identificados y estudiados en *A. baumannii* son; proteínas de membrana externa (tales como OmpA, Omp33-36 u Omp22), el lipopolisacárido (LPS), el polisacárido capsular, las fosfolipasas (PLC y PLD), las vesículas de membrana externa, la proteína de unión a penicilina (PBP7/8), los sistemas de secreción tipo II, V y VI o el sistema de captación de hierro mediado por acinetobactina, entre otros (Lee *et al.*, 2017).

#### SISTEMAS DE CAPTACIÓN DE HIERRO EN *Acinetobacter baumannii*

El hierro es un elemento esencial para los patógenos que pretenden invadir un organismo, pero también para las células del huésped que intentan impedir dicha colonización. Su participación en numerosas reacciones vitales como cofactor enzimático (Koster *et al.* 2005), hace del hierro un elemento crucial durante la infección, donde tendrá lugar la competencia por el hierro entre el patógeno y el huésped (Cherayil, 2011).

Los pacientes infectados por *Acinetobacter baumannii* cuentan con un entorno limitado en hierro que controla el crecimiento bacteriano. En consecuencia, el patógeno se ha visto obligado a desarrollar sistemas de alta afinidad de adquisición de hierro, al ser este metal fundamental para su persistencia, proliferación y virulencia (Penwell *et al.*, 2012).

*A. baumannii* puede expresar distintos sistemas de captación de hierro, siendo el mejor caracterizado el sistema mediado por el sideróforo acinetobactina (quelante de hierro). Éste se identificó en la cepa ATCC 19606 por primera vez y se basa en la producción y utilización de la acinetobactina (Yamamoto *et al.*, 1994).

La adquisición de hierro mediada por la acinetobactina es un importante factor de virulencia de *A. baumannii* en condiciones limitantes de hierro, indispensable para la persistencia y la capacidad de causar citotoxicidad, así como para causar la muerte. Los sistemas de captación de hierro podrían utilizarse como diana terapéutica (Gaddy *et al.*, 2012).

Los genes implicados en la biosíntesis, transporte y recepción de la acinetobactina se agrupan dentro del genoma de *A. baumannii*. Forman en su conjunto un cluster de genes (Figuras 1 y 2) donde las proteínas codificadas por los genes *basA*, *basB*, *basC*, *basE*, *basD*, *basF*, *basG*, *basH*, *basI* y *basJ* se encargan de la biosíntesis, las proteínas codificadas por los genes *barA* y *barB* transportan la molécula y, finalmente, la recepción está codificada por los genes *bauA*, *bauB*, *bauC*, *bauD*, *bauE* y *bauF* (Hasan et al., 2015).

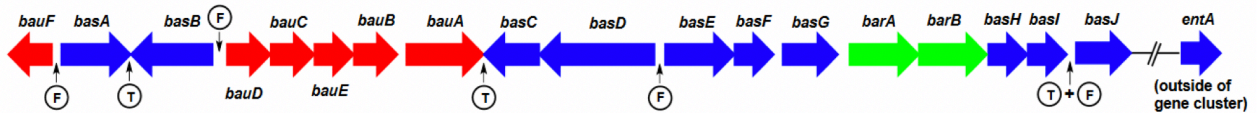


Figura 1. Mapa del cluster de genes de acinetobactina de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978, en el que aparecen 18 regiones codificantes implicadas en la biosíntesis (azul), liberación (verde) y recepción (rojo) de la acinetobactina (Shapiro et Wenczewicz, 2016).

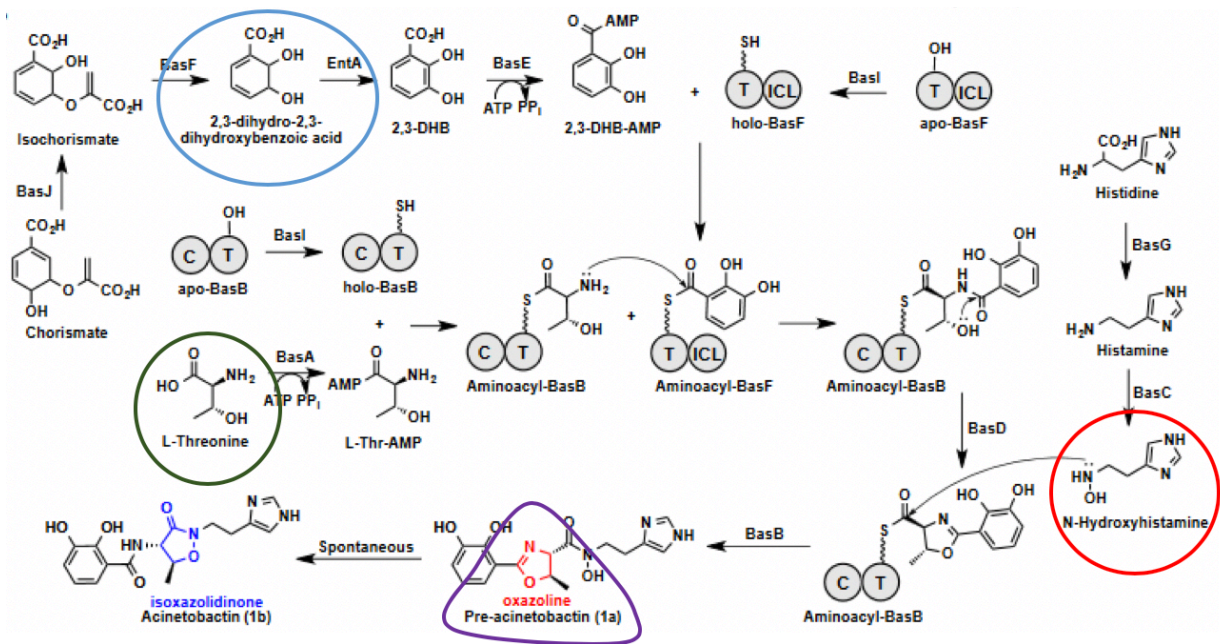


Figura 2. Ruta de síntesis de la acinetobactina (Shapiro et Wenczewicz, 2016).

Por otro lado, se observó que el gen *entA*, que codifica la enzima 2,3-dihidroxibenzoato deshidrogenasa, estaba localizado fuera del cluster (Figuras 1 y 2). Esta enzima es necesaria para la producción del ácido dihidroxibenzoico (DHBA), compuesto presente en la molécula de acinetobactina. El estudio de *entA* sugirió que este gen podría estar involucrado en la adquisición de hierro por *A. baumannii* (Penwell et al., 2012).

## OBJETIVO

El objetivo de este trabajo consistió en realizar un mutante de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978 eliminando de su genoma el gen A1S\_2579 (homólogo a *entA*) para poder conocer su importancia dentro del sistema de adquisición de hierro mediado por la acinetobactina.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### CEPAS BACTERIANAS

Para el experimento se emplearon dos cepas bacterianas, *A. baumannii* ATCC 17978 y *E.coli* TG1. Ambas cepas fueron cultivadas previamente en un medio Luria-Bertani (LB) suplementado con un 2% de agar, para posteriormente incubarlas a 37 °C y agitación (180 rpm). Se conservaron a -80 °C en medio LB con un 10% de glicerol. El medio de cultivo fue suplementado con kanamicina (Km) a una concentración final de 50 µg/mL para la selección de las cepas recombinantes.

### OLIGONUCLEÓTIDOS

Los oligonucleótidos usados en el presente estudio se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Oligonucleótidos usados en el presente estudio.

Oligonucleótido	Secuencia	Uso
A1S_2579 UP forward	5'GCGGCCGCCATTGTTGATCTTGCTGAAT 3'	Amplificación de la región UP
A1S_2579 UP reverse	5'GATATCAGAAAATTGCCTTAACCGAA 3'	Amplificación de la región UP
A1S_2579 DOWN forward	5'GATATCATTTCTCTTGTGTTTCTGCT 3'	Amplificación de la regiónDOWN
A1S_2579 DOWN reverse	5'GGATCCATTTTCATATTGGAGCACGAA 3'	Amplificación de la región DOWN
pMO2Forward	5'ATT CAT GAC CGT GCT GAC 3'	PCR de chequeo de las colonias recombinantes
pMO2Reverse	5'CCT GTC TGT AAG CGG ATG 3'	PCR de chequeo de las colonias recombinantes
A1S_2579 intUP forward	5'TTTCTTGATGGTCAACTGAT 3'	PCR de chequeo de las colonias sin el gen
A1S_2579 intDOWN reverse	5'AGGAGGTGATTAACAATATC 3'	PCR de chequeo de las colonias sin el gen

## OBTENCIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

Los preinóculos bacterianos se prepararon partiendo de una colonia aislada en placa de LB agar cultivada en 5 mL de LB durante una noche. A continuación, para preparar el inóculo se diluyó 1 mL del preinóculo en 100 mL de LB y el inóculo se incubó a 30 °C en agitación (180 rpm) hasta que el cultivo alcanzó la fase exponencial ( $OD_{600nm}=0,8$ ). Después, se realizaron células electrocompetentes manteniendo las células en hielo en todo momento. Se centrifugó el cultivo durante 5 min a 6.500 rpm y se decantó y descartó con cuidado el sobrenadante, para después realizar un primer lavado añadiendo finalmente 50 mL de glicerol al 10 % (conservado hasta el momento en hielo). Nuevamente se centrifugó el cultivo durante 5 min a 6.500 rpm e inmediatamente se colocó en hielo. Se descartó el sobrenadante y se realizó a cabo un segundo lavado añadiendo 50 mL de glicerol al 10% (conservado en hielo). Se resuspendió el contenido del tubo pipeteando y se mantuvo una vez más en hielo. Se volvió a centrifugar de la misma manera, se descartó el sobrenadante y se realizó un tercer lavado (de idéntica manera al lavado anterior). Se resuspendió el contenido con la pipeta y se colocó en hielo. Tras una última centrifugación de 5 min y 6500 rpm, se retiró el sobrenadante, se añadieron 200  $\mu$ L de glicerol y se resuspendió el pellet. Finalmente se repartieron 50  $\mu$ L por tubo *Eppendorf*.

## CONSTRUCCIÓN DEL MUTANTE

Este proceso tuvo como punto de partida la amplificación y clonación de las regiones aguas arriba (UP) y aguas abajo (DOWN) del gen de interés (A1S\_2579). Para ello, se usaron los oligonucleótidos A1S\_2579 UP forward y A1S\_2579 UP reverse para amplificar la región UP, y A1S\_2579 DOWN forward y A1S\_2579 DOWN reverse para amplificar la región DOWN mediante PCR. EL programa de PCR empleado para este proceso fue de 98 °C durante 2 min, 29 ciclos de 98 °C durante 15 s, 52 °C durante 15 s y 72 °C durante 1 min una elongación final de 72°C durante 10 min. Para ello, se usó el plásmido pMO130-TelR que procede del vector pMO-130 (Figura 3) al que se le ha insertado un gen de resistencia a telurito. Este plásmido es un vector suicida que contiene los genes *xyIE*, *sacB* y los cassettes de resistencia a telurito y kanamicina (Álvarez-Fraga *et al.* 2018).

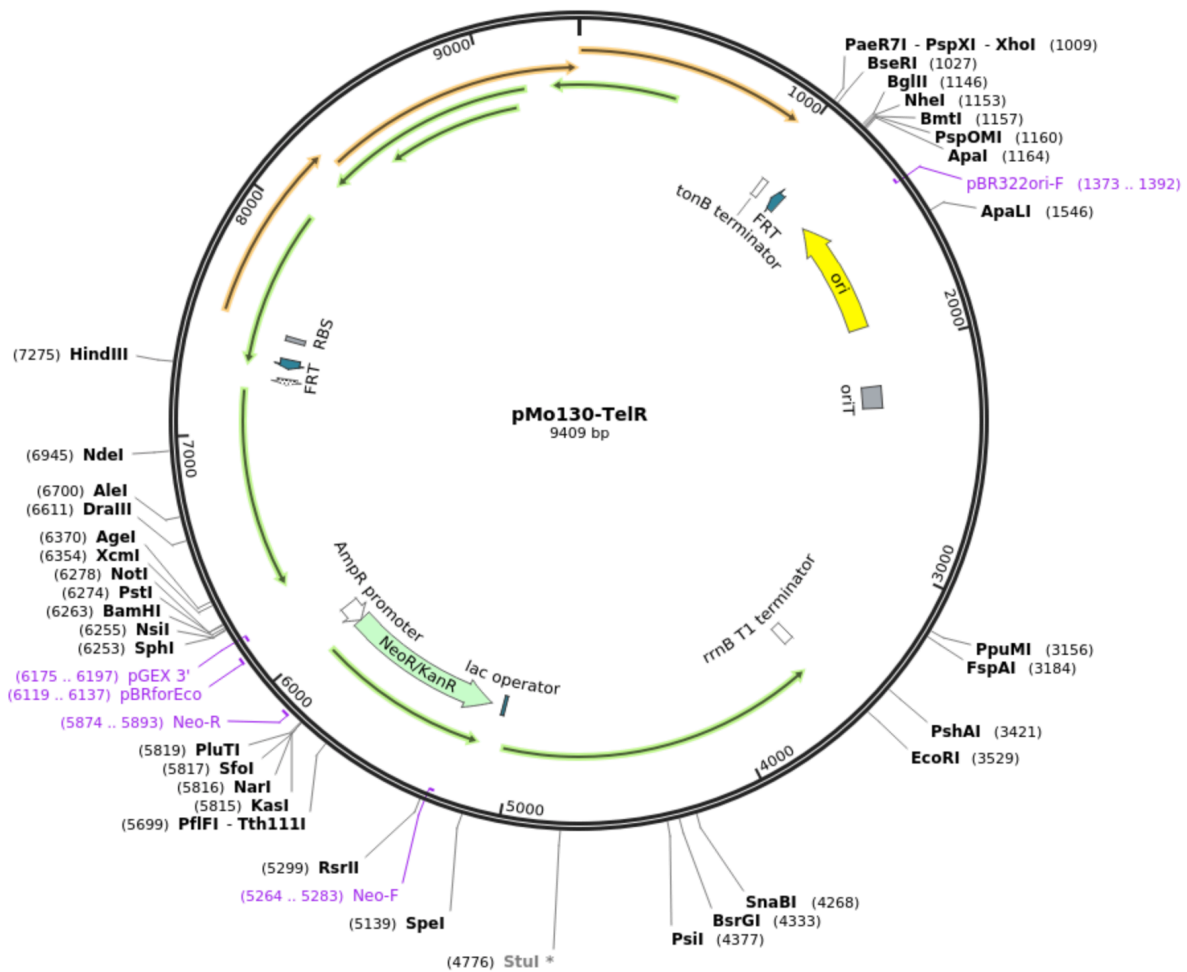


Figura 3. Plásmido pMO130-TelR. (Amin *et al.* 2013).

Tras la amplificación mediante PCR, se procedió a purificar el DNA usando el kit GENE JET PCR PURIFICATION KIT (Thermo Fisher Scientific) y posteriormente a la digestión enzimática usando las enzimas descritas en la Tabla 2. Para llevar a cabo la digestión se mezclaron a 37 °C entre 1 y 5 µg de DNA con 1 µL de una enzima, 1 µL de la otra enzima, 3 µL de tampón y la cantidad de agua necesaria para llegar a 30 µL totales.

Después, se purificó usando el GENE JET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit (Thermo Fisher Scientific) y se procedió a ligar las regiones UP y DOWN con el plásmido. La ligación se realizó mezclando 0.2 µL de enzima fosfatasa (ligasa), 2 µL de tampón, 5 µL de DNA, 1 µL de plásmido y la cantidad de agua necesaria para llegar a 20 µL. El programa para la ligación se basa en someter la mezcla a 22 °C durante 1h y 15 min y luego a 70 °C durante 5 min para inactivar la ligasa.

Tabla 2. Enzimas de restricción utilizadas en el presente trabajo.

Fragmentos	Enzimas de restricción
UP	ecoRV, NotI
DOWN	ecoRv, BamHI
PILÁSMIDO	NotI, BamHI

El plásmido resultante se usó para electroporar, primero en células de *E. coli* TG1 y, luego, para transformar células de ATCC 17978. Tras la selección con kanamicina de las colonias recombinantes se añadió pirocatecol visualizándose así una coloración amarilla resultante de la actividad del gen *xyIE* (Hamad *et al.*, 2009). Estas colonias se sembraron en 5 mL de LB suplementado con sacarosa al 20 % y se dejaron crecer una noche en agitación (180 rpm). El gen *sacE* impide el crecimiento de la bacteria en presencia de sacarosa, por lo que ésta expulsa el plásmido llevándose consigo al gen de interés. Luego se sembraron en LB sin antibiótico, se seleccionaron las colonias blancas (sin el gen) tras el uso de pirocatecol. Finalmente, estas colonias se sometieron a una amplificación por PCR usando los oligonucleótidos UP Forward y UP Reverse (UP), intUP e intDOWN (internos) y los primers DOWN Forward y DOWN Reverse (DOWN). Finalmente el producto de PCR se envió a secuenciar a un servicio externo.

## EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDO

La extracción de DNA plasmídico se realizó utilizando el kit Gene JET Plasmid Miniprep kit (Thermo Fisher Scientific).

## RESULTADOS

Tras conseguir ligar el plásmido con las regiones UP y DOWN del gen AS1\_2579, previamente amplificadas, se electroporó en células de *E. Coli* TG1 para su clonación y posteriormente electroporación en células de ATCC 17978.

Al comienzo del proceso, para poder verificar la amplificación de los fragmentos UP y DOWN del gen AS1\_2579 mediante PCR, se realizó una electroforesis en gel de agarosa donde se observó con claridad las bandas esperadas.

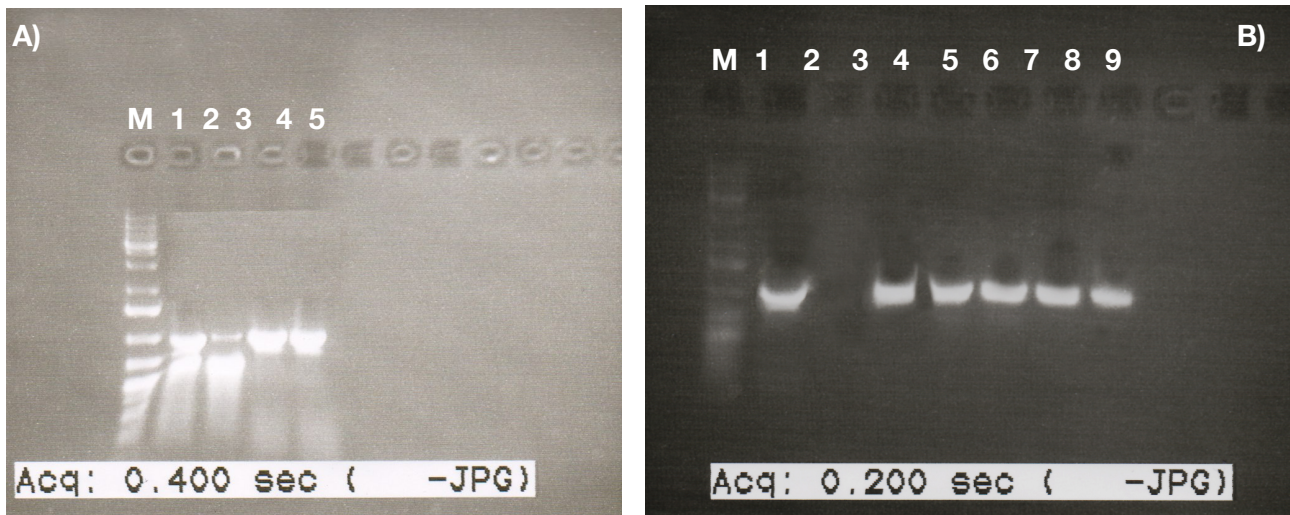


Figura 4. A) Amplificación de la región DOWN (carriles 3 y 4). Los carriles 1 y 2 no son de interés para este trabajo. B) Amplificación de la región UP (carriles 1 y 3) del gen AS1\_2579. La primera columna (M) hace referencia al marcador de peso molecular GENERuler 1kb Plus DNA Ladder.

Antes de proceder a cortar los productos de la PCR y el plásmido con las enzimas de restricción, se purificó el DNA y se cuantificó para hacer un corte adecuado (Tabla 3).

Tabla 3. Cuantificación de DNA antes de la digestión enzimática. Abs 260/A 230 y la Abs 260/ A280 hacen referencia a la cantidad de alcoholes y a la cantidad de proteínas respectivamente para cada muestra.

<i>A.baumannii</i> ATCC <i>entA</i>	Concentración (ng/ $\mu$ L)	Abs 260/A 230	Abs 260/ A280
UP	150.2	1.190	1.850
DOWN	72.91	1.495	1.835

Los resultados fueron los esperados puesto el nivel de purificación fue óptimo. Por lo tanto, fue posible proseguir con la digestión mediante las enzimas de restricción. Tras la digestión de los insertos y el plásmido se purificó y cuantificó de nuevo el DNA (Tabla 4.)



Tabla 4. Cuantificación de DNA de las muestras mediante Nanodrop tras la digestión.

<i>A.baumannii</i> ATCC <i>entA</i>	Concentración (ng/μL)	Abs 260/A 230	Abs 260/ A280
PLÁSMIDO	41.63	2.361	1.839
UP	21.12	3.450	1.899
DOWN	20.23	1.422	1.899

Se comprobó que las moléculas estaban bien purificadas, por lo que fue posible ligar los fragmentos UP y DOWN con el plásmido y usar la nueva construcción para electroporar células de *E. coli* TG1.

Se realizó una amplificación por PCR de chequeo para comprobar si las colonias de *E.coli* TG1 portaron el plásmido recombinante. Se comprobó mediante electroforesis la presencia del plásmido en las colonias (Figura 5). Se observó la presencia de plásmidos recombinantes en los carriles 3, 7, 10, 15, 16, 20 y 21, tal como se aprecia por la presencia de una banda de 2000 pb.

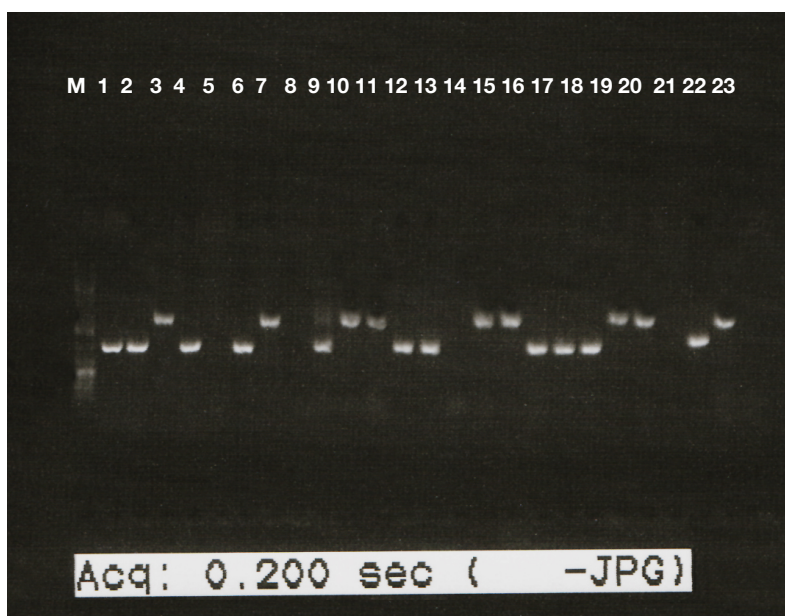


Figura 5. Chequeo de colonias recombinantes de *E.coli* TG1 mediante PCR. M marcador de peso molecular GENERuler 1kb Plus DNA Ladder.

Para continuar el trabajo se eligieron las colonias de los carriles 3, 7, 15 y 16, por tener éstos unas bandas más claras.

El plásmido recombinante se extrajo y se usó para electroporar células de *A. baumannii*. Tras el uso de pirocatecol, se sembraron en kanamicina. Las colonias amarillas, indicaron la presencia del plásmido en *A. baumannii*. Aún así, con el fin de corroborar este resultado, se realizó una amplificación por PCR a dichas colonias.

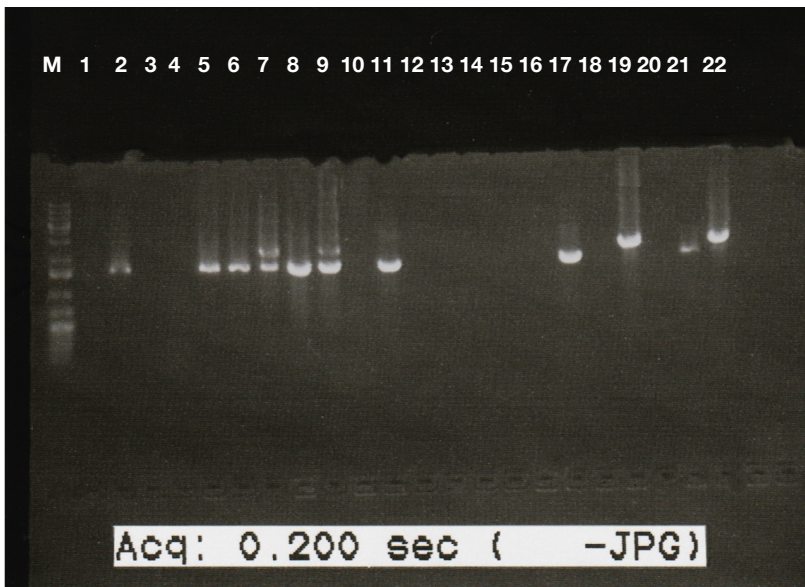


Figura 6. Chequeo de las colonias de *A. baumannii* ATCC 17978 recombinantes mediante PCR A) usando los primers PMO2fw e intDOWN (carriles del 1 al 11) y B) usando los primers PMO2Rv e intUP (carriles del 12 al 22). La primera columna (M) hace referencia al marcador de peso molecular GENERuler 1kb Plus DNA Ladder.

El plásmido puede recombinar con el genoma en la región UP o en la región DOWN. Las muestras de los carriles 8, 11, 19 y 22 mostraron recombinación. Ya que las colonias 19 y 22 exhibieron una banda de aproximadamente 1500 pb (región UP más la mitad de la región DOWN) y las colonias 8 y 11 de 2500 pb (la mitad de región UP, más el gen y la región DOWN), se llegó a la conclusión de que el plásmido recombinó con la región UP.

Las colonias recombinantes fueron sembradas en LB con sacarosa donde expulsaron el plásmido y después se seleccionaron en medio LB utilizando pirocatecol. Este compuesto dejó de color blanco a las colonias que no portaban el gen, lo cual se chequeó de nuevo mediante amplificación por PCR.

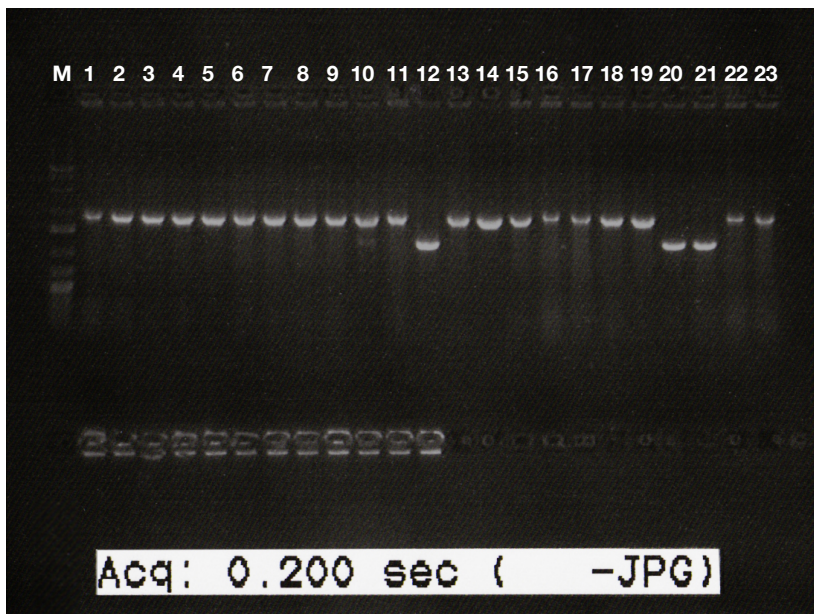


Figura 7. PCR de chequeo de las colonias de *Acinetobacter baumannii* empleando los primers intUP e intDown.

Las colonias ubicadas en los carriles 12, 20 y 21 presentaron bandas de menor peso molecular, indicando la ausencia del gen AS1\_2579. En el resto de las colonias, a pesar de que las bacterias también expulsaron el plásmido, éste no consiguió arrastrar consigo el gen fuera del genoma de *A. baumannii* y, en consecuencia, las bandas mostraron mayor peso molecular.

Finalmente, se realizó una última amplificación por PCR a dos de las colonias mutantes, las colonias 12 y 20 (Figura 8). Al producirse una amplificación de más o menos 1000 pb para ambas colonias, pudo concluirse que efectivamente las colonias 12 y 20 eran mutantes.

El experimento concluyó con éxito, consiguiéndose un mutante de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978. Estos mutantes carecen del gen AS1\_2579 (homólogo a *entA*), que juega un papel destacado en la síntesis de la acinetobactina, así como en la capacidad de virulencia de la bacteria.

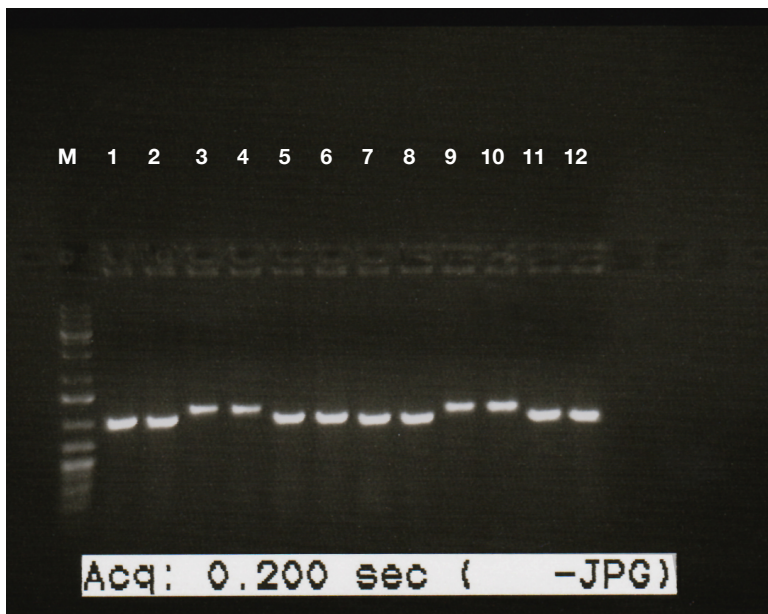


Figura 8. Chequeo de los mutantes 12 y 20 mediante PCR.

Por último, el DNA genómico de uno de los dos mutantes se envió a secuenciar a un servicio externo y se comprobó que era correcta.

## DISCUSIÓN

La alerta por bacterias resistentes a antibióticos ha ido aumentando desde la incorporación de éstos al arsenal terapéutico. Las mayores tasas de resistencia a antibióticos se han documentado en los países mediterráneos y las menores en los nórdicos, lo que concuerda con los datos de consumo de antibióticos de estas regiones (Torres Manrique, 2012).

La resistencia a los antibióticos, además de suponer un importante problema clínico, también conlleva importantes gastos económicos, estimándose en Europa un gasto de aproximadamente 1.5 billones de euros al año (European Centre for Disease Prevention and Control, 2009). Éste hecho pone de manifiesto la necesidad inmediata de encontrar soluciones a un problema creciente.

En la actualidad, *A. baumannii* se ha convertido en una de las bacterias de mayor importancia clínica, no sólo por causar gran cantidad de brotes de infección dentro de los hospitales de todo el mundo, sino por su habilidad para resistir a múltiples antimicrobianos y permanecer y expandirse en el ambiente hospitalario. Con el paso del tiempo, ha conseguido resistir el efecto de antibióticos carbapenémicos, aminoglicósidos, quinolonas y polimixinas, lo que ha complicado el manejo de las infecciones ocasionadas por esta bacteria. Incluso se ha optado por recurrir a antibióticos muy antiguos, que son a veces

los únicos eficaces para tratar determinados patógenos. El problema se agrava aún más con las limitaciones en el diagnóstico y la carencia de métodos fenotípicos estandarizados que permitan detectar los mecanismos de resistencia específicos (Vanegas-Múnera *et al.*, 2014).

En comparación con otras bacterias gram-negativas, se han descrito muy pocos factores de virulencia en *A. baumannii*, los cuales determinan su patogenicidad. Uno de los más destacados es el factor de virulencia relacionado con la captación de hierro mediado por acinetobactina. Con la finalidad de arrojar luz sobre este asunto se han realizado numerosos experimentos, como el llevado a cabo por Conde *et al.*, 2019., donde estudiaron el papel de cada uno de los genes del cluster de la acinetobactina mediante la construcción de mutantes knock-out y su posterior inoculación en ratones, a fin de determinar su grado de implicación durante el curso de una infección *in vivo*. Observaron que las cepas sin los genes A1S\_2379 (*basG*), A1S\_2382 / 83 (*basD*), A1S\_2384 (*basC*) y A1S\_2390 (*basB*) mostraron una disminución notable de la tasa de crecimiento y una reducción parcial de esta tasa en la cepa que carece del gen A1S\_2391 (*basA*).

Las tasas de supervivencia de los ratones fueron mayores en los mutantes que carecían de los genes A1S\_2379 (*basG*), A1S\_2382 / 83 (*basD*), A1S\_2384 (*basC*) y A1S\_2390 (*basB*), en comparación con la cepa de tipo salvaje ATCC 17978. Las cepas que carecían de los genes A1S\_2375 (*barB*) o A1S\_2376 / 77/89 (*barA*) mostraron una disminución aguda de la tasa de crecimiento. En las cepas que carecían de los genes A1S\_2386 (*bauB*), A1S\_2387 (*bauE*), A1S\_2388 (*bauC*) y A1S\_2389 (*bauD*) observaron una reducción parcial. Las tasas de supervivencia de los ratones fueron mayores en los mutantes  $\Delta$ 2385 (*bauA*),  $\Delta$ 2375 (*barB*) y  $\Delta$ 2376 / 77/78 (*barA*) en comparación con la cepa de tipo salvaje ATCC 17978.

Estos investigadores concluyeron que ciertos genes alojados fuera del cluster de la acinetobactina podrían ser importantes para el sistema. Tal es el caso de *entA*, clave en la síntesis de acinetobactina, aunque también se ha encontrado en la síntesis de otros dos sideróforos de *A. baumannii* ATCC 17978, baumanoferrina y fimsbactina.

Se espera que la eliminación de este gen reduzca notablemente la capacidad de captación de hierro de la bacteria y, por tanto, su virulencia. Esto podría corroborarse sometiendo el mutante que carece del gen A1S\_2579 (homólogo a *entA*) obtenido en este trabajo, a un experimento que informe sobre su capacidad de captar hierro.

Todos estos genes citados, entre los que se incluye *entA*, están involucrados directamente en la patogenicidad de la bacteria. Si se lograra describir una relación de genes relacionados con la patogénesis de *A. baumannii* sería posible comenzar a diseñar nuevas dianas terapéuticas como, por ejemplo, moléculas antisentido que puedan bloquear su transcripción genética, inhibiendo la virulencia (Conde *et al.*, 2019)

## CONCLUSIÓN

El gen *entA* fue eliminado con éxito del genoma de la cepa de *A. baumannii* ATCC 17978 obteniéndose un mutante knock-out. La elaboración de cepas mutantes de los genes del cluster de la acinetobactina y de genes homólogos a éstos situados fuera del cluster arrojaron resultados que pueden servir como base para encontrar nuevas dianas terapéuticas en un futuro.

## CONCLUSIÓN

O xen *entA* foi eliminado con éxito do xenoma da cepa *A. baumannii* ATCC 17978 obténdose un mutante knock-out. A elaboración de cepas mutantes dos xenes do cluster da acinetobactina e de xenes homólogos a éstos situados fóra do cluster deu resultados que poden servir como base para atopar novas dianas terapéuticas nun futuro.

## CONCLUSION

The *entA* gene was successfully eliminated from the genome of *A. baumannii* strain ATCC 17978, obtaining a knock-out mutant. The development of mutant strains of the genes of the cluster of acinetobactin and genes homologous to these located outside the cluster yielded results that can serve as a basis to find new therapeutic targets in the future.

## BIBLIOGRAFÍA

Almasaudi, A.B. (2016). *Acinetobacter spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features*. Saudi Journal of Biological Sciences; 25, 586–596. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.02.009>.

Álvarez-Fraga, L. (2018). *Caracterización de nuevos factores de virulencia del patógeno nosocomial Acinetobacter baumannii*. Tesis doctoral, Universidad de A Coruña.

Álvarez-Fraga, L., Vázquez-Ucha, J.C., Martínez, M., Vallejo, J.A., Bou, G., Beceiro, A. y Poza, M. (2018). *Pneumonia infection in mice reveals the involvement of the feoA gene in the pathogenesis of Acinetobacter baumannii*. Virulence. 9(1):496-509. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1420451>.

Amin, I.M., Richmond, G.E., Sen, P., Koh, T.H., Piddock, L.J.V. y Chua, K.L. (2013). *A Method for generating marker-less gene deletions in multidrug-resistant Acinetobacter baumannii*. BMC Microbiology; 13:158. doi:10.1186/1471-2180-13-158.

Boucher, H.W., Talbot, G.H., Bradley, J.S., Edwards, J.E., Gilbert, D., Rice, L.B., Scheld, M., Spellbert, B. y Bartlett, J. (2009). *Bad bugs, no drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America*. Clin Infect Dis; 48: 1-12.

Cerqueira, G.M., y Peleg, A.Y. (2011). *Insights into Acinetobacter baumannii pathogenicity*. IUBMB Life,63(12): 1055–1060. DOI: 10.1002/iub.533.

Cherayil, B.J. (2011). *The role of iron in the immune response to bacterial infection*. Immunol Res; 50(1):1-9. doi:10.1007/s12026-010-8199-1.

Conde-Pérez, K., Vázquez-Ucha, J.C., Álvarez-Fraga, L., Martínez-Gutián, M., Bou, G., Beceiro, A. y Poza, M. (2019). *Genes related to the biosynthesis and reception of acinetobactin are essential for the course of a blood infection in mice caused by Acinetobacter baumannii ATCC 17978*. The Congress of ECCMID.

ECDC/EMA report (2009). *The bacterial challenge: time to react*. Available from [http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0909\\_TER\\_The\\_Bacterial\\_Challenge\\_Time\\_to\\_React.pdf](http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0909_TER_The_Bacterial_Challenge_Time_to_React.pdf)

Gaddy, J.A., Arivett, B.A., McConnell, M.J., López-Rojas, R., Pachón, J. y Actis, L.A. (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; 80:1015-1024. doi:10.1128/IAI.06279-11.

Giamarellou, H., Antoniadou, A. y Kanellakopoulou, K. (2008). *Acinetobacter baumannii: a universal threat to public health?* Int. J. Antimicrob. Agents. 32:106-119.

Hamad, M.A., Zajdowicz, S.L., Holmes, R.K. y Voskuil, M.I. (2009). *An allelic exchange system for compliant genetic manipulation of the select agents Burkholderia pseudomallei and Burkholderia mallei*. Gene; 430:123-31.

Hasan, T., Choi, C.H. y Oh, M.H. (2015). *Genes Involved in the Biosynthesis and Transport of Acinetobactin in Acinetobacter baumannii*. Genomics Inform; 13(1):2-6. <http://dx.doi.org/10.5808/GI.2015.13.1.2>

Hernández-Torres, A., García-Vázquez, E., Yagüe, G., Gómez-Gómez, J. (2010). *Acinetobacter baumannii multirresistente: situación clínica actual y nuevas perspectivas*. Rev Esp Quimioter 23(1):12-19.

- Koster, W. (2005). *Cytoplasmic membrane iron permease systems in the bacterial cell envelope*. *Frontiers in Bioscience* ;10:462-77.
- Lee, C.R., Lee, J.H., Park, M., Park, K.S., Bae, I.K., Kim, Y.B., Cha, C.J., Jeon, B.C. y Lee, S.H. (2017). *Biology of Acinetobacter baumannii: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 7:55. doi: 10.3389/fcimb.2017.00055.
- Lortholary, O., Fagon, J.Y., Hol, A.B., Slama, M.A., Pierre, J., Giral, P., Rosenzweig, R., Gutmann, L., Safar, M. y Acar, J. (1995). *Nosocomial acquisition of multiresistant Acinetobacter baumannii: risk factors and prognosis*. *Clin Infect Dis*; 20(4): 790-796.
- Marcos, M.A. (1995). *Acinetobacter baumannii*. Departamento de microbiología y parasitología. Hospital Clínic. Universidad de Barcelona.
- Merino-Carballeira, M. (2015). *Estudio de un brote epidémico causado por distintas cepas de Acinetobacter baumannii multirresistente. Estudio de la epidemividad y virulencia*. Tesis doctoral, Universidad de A Coruña.
- Moynié, L., Serra, I., Scorciapino, M.A., Oueis, E., Page, M. GP., Ceccarelli, M., y Naismith, J.M. (2018). *Preacinetobactin not acinetobactin is essential for iron uptake by the BauA transporter of the pathogen Acinetobacter baumannii*. *eLIFE Biochemistry and Chemical Biology* 7:e42270. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.42270.001>.
- Peleg, A.Y., Seifert, H. y Paterson, D.L. (2008). *Acinetobacter baumannii: emergence of a successful pathogen*. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*; 21(3):538-582. doi:10.1128/CMR.00058-07.
- Penwell, W.F., Arivett, B.A. y Actis, L.A. (2012). *The Acinetobacter baumannii entA Gene Located Outside the Acinetobactin Cluster Is Critical for Siderophore Production, Iron Acquisition and Virulence*. *PLoS ONE* 7(5): e36493. doi:10.1371/journal.pone.0036493
- Pulcini, C., Bush, K., Craig, W.A., Frimodt-Moller, N., Grayson, M.L., Mouton, J.W., Turnidge, J., Harbarth, S., Gyssens, I.C. y ESCMID Study Group for Antibiotic Policies (2012). *Forgotten antibiotics: an inventory in Europe, the United States, Canada, and Australia*. *Clinical Infectious Diseases*; 54(2):268–74.



Shapiro, J. A. y Wencewicz, T. A. (2016). *Acinetobactin Isomerization Enables Adaptive Iron Acquisition in Acinetobacter baumannii through pH- Triggered Siderophore Swapping*. ACS Infectious Diseases 2:157-168.

Salazar de Vegasa, E.Z. y Nieves, B. (2005) *Acinetobacter spp.: Aspectos microbiológicos, clínicos y epidemiológicos*.

Torres, C. (2012). *La resistencia bacteriana a los antibióticos, siete décadas después de Fleming*. Academia de Farmacia del Reino de Aragón [serial on the Internet].

Towner, K.J. (2009). *Acinetobacter: an old friend, but a new enemy*. Journal of Hospital Infection; 73(4):355-363.

Trigo-Tasende, N. (2018). *Sistema de biosíntesis de acinetobactina en Acinetobacter baumannii. Implicación en virulencia y caracterización de nuevas dianas terapéuticas*. Trabajo de fin de máster, Univerddade da Coruña.

Vanegas-Múnera, J.M., Roncancio-Villamil, G. y Jiménez-Quiceno, J.N. (2014). *Acinetobacter baumannii: importancia clínica, mecanismos de resistencia y diagnóstico*. Revista CES MEDICINA ; 28(2): 233-246

Vila, J., Marti, S. y Sanchez-Cespedes, J. (2007). *Porins, efflux pumps and multidrug resistance in Acinetobacter baumannii*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy; 59(6): 1210-1215. doi:10.1093/jac/dkl509.

World Health Organization. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. [http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short\\_Summary\\_25Feb-ET\\_NM\\_WHO.pdf](http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf)2017.