

Estudio de un brote epidémico causado por distintas cepas de
Acinetobacter baumannii multirresistente. Estudio de la
epidemicidad y virulencia.

María Merino Carballeira

Tesis Doctoral

Septiembre 2015

Directores, Dr. Germán Bou Arévalo y Dra. Margarita Poza Domínguez

Tutor, Dr. Isaac Fuentes Boquete

Programa de doutoramento en Ciencias da Saúde

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



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Los directores de esta tesis doctoral, D. Germán Bou Arévalo, Doctor en Ciencias Biológicas por la Universidad Autónoma de Madrid, Jefe de Servicio de Microbiología del Complejo Hospitalario Universitario A Coruña y profesor de la Universidad de Santiago de Compostela y Dña. Margarita Poza Domínguez, Doctora en Biología por la Universidad de Santiago de Compostela e Investigadora del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña,

CERTIFICAN:

que Dña. María Merino Carballeira, Licenciada en Biología por la Universidad de A Coruña, ha realizado en el Servicio de Microbiología y en el Instituto de Investigación Biomédica (INIBIC) del Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, y bajo su dirección y tutela, respectivamente, el trabajo “Estudio de un brote epidémico causado por distintas cepas de *Acinetobacter baumannii* multirresistente. Estudio de la epidemividad y virulencia”, el cual, reúne todas las condiciones para ser presentado como Tesis Doctoral.

Y para que así conste, y surta los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en A Coruña, a 21 de Septiembre de 2015.

Dr. Germán Bou Arévalo

Director

Dra. Margarita Poza Domínguez

Directora

D. Isaac Fuentes Boquete, profesor del Departamento de Medicina de la facultad de Ciencias de la Salud, en la Universidad de A Coruña,

CERTIFICA:

que Dña. María Merino Carballeira, Licenciada en Biología por la Universidad de A Coruña, ha realizado en el Servicio de Microbiología y en el Instituto de Investigación Biomédica (INIBIC) del Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, bajo su tutela el trabajo “Estudio de un brote epidémico causado por distintas cepas de *Acinetobacter baumannii* multirresistente. Estudio de la epidemicidad y virulencia” el cual reúne todas las condiciones para ser presentado como Tesis Doctoral.

Y para que así conste, y surta los efectos oportunos, firmo el presente certificado en A Coruña, 21 de Septiembre de 2015

Dr. Isaac Fuentes Boquete

Tutor

AGRADECIMIENTOS

No ha sido un camino fácil llegar hasta aquí, por eso, solo queda dar las gracias. Seguro que me olvido de gente que de un modo u otro ha contribuido a que esta tesis doctoral salga adelante. Muchísimas gracias a todas esas personas que han estado todos estos años apoyándome, enseñándome, queriéndome... Quien me iba a decir a mi cuando empecé a estudiar biología, que acabaría siendo Doctora!!!!

En primer lugar, dar las gracias a mis directores de tesis, Germán y Marga, sin los cuales este trabajo no habría sido posible. Germán, gracias por haber confiado en mí, acogerme en tu grupo de investigación cuando era una chavala recién licenciada con un expediente *normalito*, y darme la oportunidad de probar y disfrutar de hacer ciencia. Marga, gracias por ser la mejor codi del mundo, sin tu ayuda y apoyo estoy segura de que no habría llegado hasta aquí. Gracias por esos abrazos mañaneros, por tus palabras y consejos para todo y para todos, y por ese punto de locura con el que hemos conectado que hace que pasar tantas horas en el labo sea divertido. Ha sido y es, un placer tenerte en mi vida como una hermana mayor.

Gracias a las Codis por ser más que compañeras, Astrid (generosa incansable, planificadora de eventos varios, solo tú eres capaz de liarnos hasta para hacer viajes al lejano oeste), Soraya (unha amiga de dez, gracias por esas ostias de realidade tan apropiadas de vez en cando e porque sé que adoras os meus abraciños e os meus chistes) y Laura (gracias por tu disponibilidad infinita para todo, eres la mejor cocinera del mundo), porque realmente funcionamos como un equipo. A las Emp*****oras, gracias por las tertulias y consejos, por aguantar mis chapas y chistes malos en todo momento, sobre todo durante los momentos de encierro a altas horas de la mañana. A mis compañeros del lab con los que tantos momentos he compartido dentro y fuera, con los que me he reído sin parar, llorado, bailado, viajado, y un sinfín de actividades; Astrid, Soraya, Laura, Anita (siempre recordaré con cariño tus panic attacks), Susi, Carlos (empezamos juntos y eres mi Carlos II de Sigrás), Jesús, Eva (a tope de power hasta el final), MariaLó (solo tú te ríes de mis chistes), Silvia, Marta, Juan, Alex, Juan Carlos, Jose, Miriam, Clara, Mariki, Patri y María, gracias por prestarme vuestra ayuda, porque además de ser buenos científicos, sois mejores personas. Sé que me llevo grandes amigos, amigos de esos que son para siempre. ¡¡¡Abrazitos para todos!!!! XD

A mis compañeros del INIBIC (en especial a Dolo, Isa, MaríaF, Mariajo, Juan, Romi, Laura) y a los compis del servicio de Microbiología (Begoña, David, Isa, Diana, Bea, Elena...)

Agradecimientos

gracias por los desayunos, cafés y consejos compartidos. MJose, desde el minuto uno que nos conocimos conectamos, gracias por ser mi otro yo...

A mis grandes amigos, Boque, Cruz, Dani y Lore, Ferchi, Cris y Fer, Fu, a las Pestrus y sus bebes (ochooo ya!), a las Cabras, a las Nenas, gracias por creer en mí y repetirme que podemos, por esos momentos de desconexión llenos de risas y diversión.

A Mauro, gracias por quererme tanto, por tener una paciencia más que infinita conmigo y por esa visión tan positiva de la vida, que hace que mi mundo sea mucho mejor.

A mi familia (incluido a mi príncipe de la galaxia y el universo Coquito), porque gracias a ellos soy lo que soy y como soy. Papá, mamá y Carmenchu, siempre tan preocupados y entregados, gracias por estar tan orgullosos de mí y apoyarme en todo momento. Sois los mejores y la admiración es mutua. El abuelo Paco, orgulloso de nosotros a su manera, presume de tener una nieta enfermera y el abuelo Luis, siempre dispuesto a hacer mil locuras por nosotras, al que tanto le gustaba mi letra, habría sido mi mejor fan.

Comienza una nueva etapa pero antes de nada..... ¡GRACIAS POR TODO!

ÍNDICE GENERAL

1. Introducción	25
1.1. El género <i>Acinetobacter</i> spp.	25
1.2. El patógeno <i>Acinetobacter baumannii</i>	28
1.2.1 Importancia clínica de <i>Acinetobacter baumannii</i>	29
1.3. Métodos de identificación	30
1.4. Mecanismos de resistencia a antimicrobianos	31
1.4.1. Antibióticos β -lactámicos. Mecanismos de resistencia	32
1.4.1.1. Modificación de la diana del antimicrobiano	34
1.4.1.2. Control de la permeabilidad de membrana. Porinas y Bombas de expulsión	35
1.4.1.3. Producción de β -lactamasas. Origen, clasificación y diseminación	36
1.5. Mecanismos de intercambio genético: transferencia de genes de resistencia	44
1.5.1. Transformación	44
1.5.2. Transducción	45
1.5.3. Conjugación	45
1.5.4. Transmisión a través de vesículas de membrana	45
1.6. Patogénesis y factores de virulencia en <i>A. baumannii</i>	46
1.6.1. Factores de virulencias relacionados con adherencia	46
1.6.2. Factores de virulencias relacionados con biofilm	48
1.6.3. Factores de virulencias relacionados con la motilidad	49
1.6.4. Factores de virulencias relacionados con polisacáridos de superficie	50
1.6.5. Factores de virulencias relacionados la permeabilidad de la membrana	50
1.6.6. Factores de virulencias relacionados con las vesículas de membrana externa (OMVs)	51
1.6.7. Factores de virulencias relacionados con la producción de enzimas hidrolíticas	51
1.6.8. Factores de virulencias relacionados con proteínas de unión a la	

penicilina (PBPs)	51
1.6.9. Factores de virulencias relacionados con el transporte de hierro	52
1.6.10. Factores de virulencias relacionados con quorum sensing	52
1.7. Plasticidad genómica de <i>A. baumannii</i>	52
2. Objetivos	55
3. Capítulos	59
3.1. Capítulo I. Descripción de un brote nosocomial causado por una cepa de <i>Acinetobacter baumannii</i> portadora de una carbapenemasa tipo OXA-24 en España.	61
3.2. Capítulo II. El gen de la β -lactamasa OXA-24 se encuentra flanqueado por los sitios de recombinación XerC/XerD-like en los diferentes plásmidos de todas las cepas de <i>Acinetobacter</i> spp aisladas durante el brote.	69
3.3. Capítulo III. Secuenciación del genoma completo de la cepa de <i>A. baumannii</i> multirresistente AbH12O-A2 aislada durante el brote.	75
3.4. Capítulo IV El sistema de secreción de dos componentes AbFhaB/AbFhaC-like está implicado en adherencia a superficies bióticas y en la virulencia de la cepa <i>Acinetobacter baumannii</i> AbH12O-A2.	79
3.4.1. Material y métodos	83
3.4.2. Resultados	93
4. Discusión	103
5. Conclusiones	117
6. Bibliografía	121
7. Anexos	
7.1. Anexo I	137
7.2. Anexo II	139
7.3. Anexo III	145
7.4. Anexo IV	149
7.5. Anexo V. <i>Curriculum vitae</i>	157

ABREVIATURAS

µg	Microgramo
µL	Microlitro
µm	Micrómetro
Å	Ångström
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARDRA	<i>Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis</i>
AP-PCR	<i>Arbitrary Primer Sequence-based Polymerase Chain Reaction</i>
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
ARNt	Ácido ribonucleico transferente
AT	Autotransportadoras
BLEE	β-lactamasa de espectro extendido
BSA	Albúmina de suero bovino (<i>Bovine serum albumin</i>)
CAD	<i>Collisionally Activated Dissociation</i>
CDS	Secuencia codificante de ADN (<i>Coding DNA sequence</i>)
CE	Energía de colisión (<i>Collision energy</i>)
IC	Intervalo de confianza
CID	Disociación inducida por colisión (<i>Collision-Induced Dissociation</i>)
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
cm	Centímetro
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CUR	<i>Curtain Gas</i>
CXP	<i>Collision Cell Exit Potential</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>

DP	<i>Declustering Potential</i>
DTT	Ditiotreitol
EP	Potencial de entrada (Entry Potential)
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
EM ER	<i>Enhanced MS and Enhanced resolution</i>
GS1 /GS2	<i>Ion Source Gas 1 or 2</i>
IAA	Iodoacetamida
ICL	<i>Internacional Clonal Lineage</i>
IDSA	<i>Infectious Diseases Society of America</i>
IHT	<i>Interface heater temperature</i>
IS	Secuencia de inserción (<i>Insertion Sequence</i>)
HBSS	<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>
Kb	Kilobase
KDa	Kilodalton
KV	Kilovatio
L	Litro
LPS	Lipopolisacárido
M	Molar
m/z	Relación masa/carga
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization</i>
MATE	<i>Multidrug and toxic-compound extrusion</i>
MBL	Metalo- β -lactamasas
MDR	<i>Multidrug resistance</i>
MFS	<i>Major facilitator superfamily</i>
mg	Miligramos
MH	Mueller Hinton
mL	Mililitro
MLST	Tipificación multilocus de secuencias (<i>Multilocus sequence typing</i>)

mM	Milimolar
MRM	<i>multireaction monitoring</i>
MRSA	<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
MS	Espectrometría de masas (<i>Mass spectrometry</i>)
NaCl	Cloruro sódico
nL	Nanolitro
nm	Nanómetro
O-IMV	Vesícula de membrana externa-interna (<i>Outer-inner membrane vesicle</i>)
omP	Proteína de membrana externa (<i>Outer membrane protein</i>)
OMV	Vesícula de membrana externa (<i>Outer membrane vesicle</i>)
OR	<i>Odds ratio</i>
ORF	Pauta abierta de lectura (<i>Open Reading Frame</i>)
pb	Pares de bases
PBP	Proteínas de unión a la penicilina (<i>Penicillin binding protein</i>)
PBS	Solución de fosfato salino (<i>Phosphate-buffer saline</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PCR-ESI-MS	PCR ligada a una ionización por electronebulización o electroespray (<i>ElectroSpray Ionization</i>)
PFGE	Electroforesis en campo pulsante (<i>Pulsed field gel electrophoresis</i>)
PGC	Peptidoglicano
QS	<i>Quorum sensing</i>
RAPD	<i>Randomly Amplified Polymorphic DNA</i>
REP-PCR	<i>Repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR</i>
RGD	Arginina-Glicina-Aspártico
RND	<i>Resistance nodulation division</i>
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SMR	<i>Small multidrug resistance</i>

TCA	Ácido tricloroacético
TPS	Sistema de secreción de dos componentes (<i>Two-partner secretion system</i>)
TOF	Tiempo de vuelo (<i>Time Of Flight</i>)
UCI	Unidad de cuidados intensivos
UFC	Unidad formadora de colonia
V	Vatio

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Imagen de microscopía electrónica de barrido (SEM) de *A. baumannii* AbH12O-A2.

Figura 2. Estructura química de los antibióticos β -lactámicos clínicamente más relevantes.

Figura 3. Composición de la pared celular bacteriana en microorganismos Gram-negativos y los diferentes mecanismos de resistencia a β -lactámicos, figura adaptada de LLarrul y col, 2010 (1).

Figura 4. Mecanismos de intercambio genético en bacterias Gram-negativas. Figura adaptada de Furuya & Lowy, 2006 (2).

Figura 5. Modelo de translocación en los sistemas TPS. Figura adaptada de Thanassi y col, 2005 (3).

Figuras del Capítulo IV:

Figura 1. Experimentos de adherencia a células epiteliales alveolares A549 y HeLa de las cepas de *A. baumannii* AbH12O-A2 y ATCC 17978.

Figura 2. A) Organización y orientación genética de la isla genómica de aprox. 18 Kb encontrada en el genoma de la cepa *A. baumannii* AbH12O-A2. B) Representación de los genes FhaC/FhaB del sistema de secreción de dos componentes (sistema TPS) descrito en el genoma de la cepa *A. baumannii* AbH12O-A2.

Figura 3. Identificación de los péptidos trípticos de las proteínas AbFhaB y AbFhaC utilizando la técnica de SRM/MRM.

Figura 4. A) Experimento de adherencia de la cepa de *A. baumannii* AbH12O-A2 y sus mutantes derivados isogénicos a células epiteliales humanas HeLa y células alveolares humanas A549. B) Microscopía electrónica de barrido de células epiteliales alveolares humanas (A549) infectadas con *Acinetobacter baumannii*.

Figura 5. Unión de *A. baumannii* AbH12O-A2 y sus mutantes derivados isogénicos a fibronectina inmovilizada.

Figura 6. Experimento de fertilidad en *C. elegans* incubado con la cepa de *A. baumannii* AbH12O-A2 y su mutante derivado isogénico.

Figura 7. Curva de supervivencia de ratones BALB/c (n=18 por grupo) tras una infección intraperitoneal con inóculos de 34×10^7 UFC de la cepa clínica de *A. baumannii* AbH12O-A2 y 46×10^7 UFC de la cepa mutante isogénica de *A. baumannii* AbH12O-A2 Δ fhaC.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. *Acinetobacter* spp reconocidas hasta la fecha. Tabla publicada por Visca y col. (4) y actualizada hasta Agosto de 2015.

Tabla 2. Principales mecanismos de resistencia presentes en *A. baumannii*, McConnell y col, 2013 (5).

Tabla 3. Representantes de las β -lactamasas tipo OXA hidrolizantes de carbapenemes. Tabla realizada por Evans y Amyes, 2014 (6).

RESUMO

O patóxeno oportunista *Acinetobacter baumannii* é un dos seis microorganismos multirresistentes que máis preocupa nos hospitais de todo o mundo. Isto débese á súa capacidade para persistir en ambientes extremos, xa que ten a capacidade de sobrevivir no ambiente hospitalario, e á súa versatilidade xenética, xa que ten a capacidade para desenrolar mecanismos de resistencia a antibióticos e desinfectantes. Múltiples brotes hospitalarios producíronse por cepas de *A. baumannii* multirresistentes ao longo de tódolos continentes. A presente tese de doutoramento trata do estudo dun dos brotes máis longos da historia producido por varias cepas de *A. baumannii* multirresistentes, no Hospital 12 de Octubre de Madrid durante os anos 2006-2008 e que afectou a 377 doentes.

A presente tese doutoral divídese en catro capítulos:

No capítulo 1, preséntase o estudo da epidemioloxía clínica e molecular dun brote hospitalario causado por varias cepas de *A. baumannii* multirresistentes portadoras da β -lactamasa OXA-24.

No capítulo 2, preséntase o estudo do posible mecanismo de diseminación da β -lactamasa OXA-24 entre ás distintas cepas dun mesmo brote hospitalario. Ademáis, describiuse por primeira vez unha cepa de *A. calcoaceticus* productora desta β -lactamasa OXA-24.

No capítulo 3, descríbese o xenoma completo do clon maioritario do brote hospitalario, a cepa de *A. baumannii* AbH12O-A2 (código de acceso ao GenBank: CP009534.1)

E, finalmente, no capítulo 4, descríbese a implicación dun sistema de dúas compoñentes, o sistema AbFhaB/AbFhaC, pertencente ao sistema de secreción tipo V, en adherencia a células epiteliais humanas e en virulencia.

RESUMEN

El patógeno oportunista *Acinetobacter baumannii* es uno de los seis microorganismos multirresistentes que más preocupa en hospitales de todo el mundo. Esto es debido a su capacidad para persistir en ambientes extremos, ya que es capaz de sobrevivir en el ambiente hospitalario, y a su versatilidad genética, ya que tiene la capacidad para desarrollar mecanismos de resistencia a antibióticos y desinfectantes. Múltiples brotes hospitalarios producidos por cepas de *A. baumannii* multirresistentes han sido descritos en todos los continentes. El presente trabajo aborda el estudio de uno de los brotes más importantes de la historia producido por varias cepas de *A. baumannii* multirresistentes, que surgió en el Hospital 12 de Octubre de Madrid, durante los años 2006-2008 y que afectó a 377 pacientes.

La presente tesis doctoral está dividida en cuatro capítulos:

En el capítulo 1 se presenta el estudio la epidemiología clínica y molecular de un brote hospitalario causado por varias cepas de *A. baumannii* multirresistentes portadoras de la β -lactamasa OXA-24.

En el capítulo 2 se describe el estudio del posible mecanismo de diseminación de la β -lactamasa OXA-24 entre las distintas cepas de un mismo brote hospitalario. Además, se describió por primera vez una cepa de *A. calcoaceticus* productora de la β -lactamasa OXA-24.

En el capítulo 3 se describe el genoma completo del clon mayoritario del brote hospitalario, la cepa de *A. baumannii* AbH12O-A2 (código de acceso a GenBank: CP009534.1)

Finalmente, en el capítulo 4, se describe la implicación de un sistema de dos componentes, el sistema AbFhaB/AbFhaC, perteneciente al sistema de secreción tipo V, en adherencia a células epiteliales humanas y en virulencia.

ABSTRACT

Acinetobacter baumannii is an opportunistic pathogen belonging to the six multiresistant organisms of greatest concern in hospitals worldwide. This fact is due to its ability to persist in adverse environments being able to survive in the hospital settings, and to its genetic versatility, being able to develop resistance mechanisms to antibiotics and disinfectants. Multiple hospital outbreaks caused by multidrug-resistant strains of *A. baumannii* have been described in all continents. This work is focused in the study of the largest outbreak produced by various multidrug-resistant *A. baumannii* strains, which has emerged in the Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain, affecting 377 patients during the years 2006-2008.

The present work is divided into four chapters:

In chapter 1, we studied the clinical and molecular epidemiology of the above mentioned hospital outbreak caused by various multidrug-resistant *A. baumannii* strains harboring the β -lactamase OXA-24.

In chapter 2, we described the possible spread mechanism for the β -lactamase OXA-24 among different strains during the hospital outbreak. Furthermore, the first *A. calcoaceticus* strain producing the β -lactamase OXA-24 was described.

In chapter 3, we described the complete genome of the *A. baumannii* AbH12O-A2 strain (GenBank accession code: CP009534.1), the main clone found in during the hospital outbreak.

Finally, in Chapter 4, we studied the involvement of a two component system, AbFhaB/AbFhaC, belonging to the type V secretion system, in adherence to human epithelial cells and virulence.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas representan un importante problema de salud, debido a su elevada morbimortalidad y a las implicaciones económicas que suponen para el sistema sanitario. Los antibióticos constituyen uno de los logros más importantes de la medicina durante el siglo XX, no sólo porque son la causa directa de la disminución de la morbilidad y mortalidad producida por infecciones bacterianas sino porque, además, han proporcionado el desarrollo de otras áreas médicas relacionadas con el control de la infección.

El descubrimiento de la penicilina en 1928, que fue el primer compuesto natural con actividad antibacteriana, supuso un antes y un después en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. En las siguientes décadas, el ritmo en el descubrimiento y el desarrollo de nuevas familias de antibióticos fue muy rápido. Sin embargo, este ritmo se ha ralentizado y, en las últimas décadas, muy pocas moléculas o nuevas familias de antibióticos se han incorporado al uso terapéutico. Esto supone un importante problema que dificulta el tratamiento de muchas infecciones, teniendo en cuenta el incremento alarmante de resistencia de las bacterias a estos fármacos. De hecho, muchos de los antibióticos disponibles en la actualidad están obsoletos o no son efectivos debido a la enorme plasticidad genética de las bacterias la cual les permite adaptarse y evolucionar hacia formas de resistencia (7). Así, aparecen nuevos patógenos emergentes que, en muchos casos, son portadores de resistencias intrínsecas y cuya opción terapéutica se ve reducida únicamente a un único antibiótico. Dada la situación ante la que nos encontramos y la ausencia de tratamientos eficaces frente a bacterias patógenas multirresistentes, es necesaria la creación de nuevas estrategias con el fin de optimizar y proteger el uso de los antibióticos de los que se disponen a día de hoy. Además, es importante invertir e investigar en nuevas moléculas antimicrobianas, basándonos en el descubrimiento de nuevas dianas de acción que sean útiles para combatir los microorganismos multirresistentes cuyo tratamiento está comprometido en la actualidad.

1.1. El género *Acinetobacter* spp.

La historia del género *Acinetobacter* (del griego ακινετος [akinetos], inmóvil) se remonta a comienzos del siglo XX, cuando Beijerinck, un microbiólogo danés, describió un microorganismo al que llamó *Micrococcus calcoaceticus*. Éste fue aislado del suelo tras enriquecerlo con un medio que contenía, entre otros componentes, calcio-acetato. En las siguientes décadas se describieron microorganismos similares, que fueron asignados a, al

menos, 15 géneros y especies diferentes, incluyendo *Diplococcus mucosus*, *Micrococcus calcoaceticus*, *Alcaligenes haemolysans*, *Mima polymorpha*, *Moraxella lwoffii*, *Herellea vaginicola*, *Bacterium anitratum*, *Moraxella lwoffii* var. *Glucidolytica*, *Neisseria winogradskyi*, *Achromobacter anitratum* y *Achromobacter mucosus*. La designación actual del género *Acinetobacter*, que ha sufrido múltiples cambios taxonómicos, fue inicialmente propuesta por Brisou y Prévot en 1954 con el fin de separar los microorganismos móviles de los inmóviles dentro del género *Achromobacter*, aunque no fue hasta 1968 cuando la designación del género *Acinetobacter* fue aceptada (8-10).

El género *Acinetobacter*, tal y como se define actualmente, está compuesto por un grupo heterogéneo de bacilos o cocobacilos Gram-negativos, aerobios estrictos, no fermentadores, inmóviles, catalasa-positivo, oxidasa negativo y con un contenido de guanina y citosina, en su ADN de entre el 39 % y el 47 %. Basándose en los datos taxonómicos más recientes, se ha incluido el género *Acinetobacter* en la familia *Moraxellaceae*, dentro del orden *Gammaproteobacteria*, el cual incluye los géneros *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Psychrobacter* y otros organismos relacionados.

A día de hoy, basándose en estudios de hibridación ADN-ADN y gracias a los avances en las técnicas de secuenciación de genomas completos, el género *Acinetobacter* engloba 41 especies propuestas (<http://www.bacterio.net/acinetobacter.html>), dentro de las cuales, 38 especies están validadas (Tabla 1). La última especie en ser aceptada dentro del género fue *Acinetobacter viriabilis*, dato publicado en abril del año 2015 (11, 12).

Tabla 1. Especies pertenecientes al género *Acinetobacter*.

Especie	Nº genoespecie	Referencia	Hábitat o fuente principal
<i>Acinetobacter apis</i>		Kim y col. 2014	Tracto intestinal de una abeja
<i>A. baumannii</i>	2	Bouvet and Grimont, 1986	Muestras clínicas humanas, suelo, vegetales
<i>A. baylyi</i>		Carr y col. 2003	Lodos, suelo
<i>A. beijerinckii</i>		Nemec y col. 2009	Agua, suelo
<i>A. bereziniae</i>	10	Nemec y col. 2010	Suelo, muestras humanas y vegetales
<i>A. brisouii</i>		Anandham y col. 2011	Suelo
<i>A. bohemicus</i>		Krizova y col. 2015	Suelo, agua
<i>A. boissieri</i>		Álvarez-Pérez y col. 2013	Néctar de flores
<i>A. bouvetii</i>		Carr y col. 2003	Lodos, suelo
<i>A. calcoaceticus</i>	1	Beijerinck 1911; Baumann y col. 1968	Suelo, agua, muestras clínicas humanas en menor medida
<i>A. gandensis</i>		Smet y col. 2014	Muestras de animales
<i>A. gernerii</i>		Carr y col. 2003	Lodos activados
<i>A. grimontii</i>		Carr y col. 2003	Lodos activados

<i>A. guangdongensis</i>		Feng y col. 2014	Suelo
<i>A. guillouiae</i>	11	Nemec y col. 2010	Suelo, agua, heces humanas
<i>A. gyllenbergii</i>		Nemec y col. 2009	Muestras humanas
<i>A. haemolyticus</i>	4	Bouvet and Grimont, 1986	Muestras humanas
<i>A. harbinensis</i>		Li y col. 2014	Agua de río
<i>A. indicus</i>		Malhotra y col. 2012	Vertedero
<i>A. johnsonii</i>	7	Bouvet and Grimont, 1986	Suelo, agua, piel humana y animal
<i>A. junii</i>	5	Bouvet and Grimont, 1986	Muestras humanas
<i>A. kookii</i>		Choi y col. 2013	Suelo
<i>A. lwoffii</i>	8/9	Audureau 1940; Brisou and Prévot 1954	Piel humana y animal
<i>A. nectaris</i>		Álvarez-Pérez y col. 2013	Néctar de flores
<i>A. nosocomialis</i>	13TU	Nemec y col. 2011	Muestras clínicas humanas, suelo
<i>A. pakistanensis</i>		Abbas y col. 2015	Agua de deshecho
<i>A. parvus</i>		Nemec y col. 2003	Muestras humanas y animales
<i>A. pittii</i>	3	Nemec y col. 2011	Muestras humanas, suelo y vegetales
<i>A. puyangensis</i>		Li y col. 2013	Muestra vegetal
<i>A. qingfengensis</i>		Li y col. 2014	Muestra vegetal
<i>A. radioresistens</i>	12	Nishimura y col. 1988	Suelo y muestras humanas y vegetales
<i>A. rudis</i>		Vaz-Moreira y col. 2011	Muestras de residuos
<i>A. seiferti</i>		Nemec y col. 2015	Muestras humanas
<i>A. schindleri</i>		Nemec y col. 2001	Muestras humanas
<i>A. soli</i>		Kim y col. 2009	Suelo
<i>A. tandoii</i>		Carr y col. 2003	Lodos activos
<i>A. tjernbergiae</i>		Carr y col. 2003	Lodos activos
<i>A. towneri</i>		Carr y col. 2003	Lodos activos
<i>A. ursingii</i>		Nemec y col. 2001	Muestras humanas
<i>A. viriabilis</i>		Krizova y col. 2015	Muestras humanas y animales
<i>A. venetianus</i>		Vanechoutte y col. 2009 ex Di Cello y col. 1997	Agua marina

Dentro del género *Acinetobacter* hay cuatro especies fenotípicamente muy similares y que, además, están mucho más relacionadas entre sí que con las otras especies del género: *Acinetobacter calcoaceticus*, *A. baumannii* (clínicamente la especie más importante del género), *A. pittii* (antiguamente conocida como *A. genospecie 3*) y *A. nosocomialis* (antiguamente conocida como *A. genospecie 13TU*) (13). Estas cuatro especies componen lo que se denomina complejo ACB (*A. calcoaceticus*-*A. baumannii*) (14, 15). Desde el punto de vista clínico, este complejo pertenece al grupo de mayor importancia clínica, ya que representa a la mayoría de las infecciones humanas y brotes hospitalarios producidos por *Acinetobacter* spp (13, 15, 16). Aunque el resto de especies del género *Acinetobacter* (no ACB) suelen ser sensibles a los antibióticos, se han descrito casos en los que las especies desarrollan

mecanismos de resistencia. Tal es el caso de la detección de la metalo- β -lactamasa NDM-1 descrita en una cepa de *A. schindleri* (17), de una β -lactamasa tipo OXA-134 descrita en *A. lwoffii* y *A. schindleri* (18) o de una metalo- β -lactamasa IMP-1 descrita en *A. ursingii* (19) llegando incluso a producir brotes hospitalarios (20). De todas formas, estas infecciones producidas por *Acinetobacter* sp. no pertenecientes al complejo ACB suelen llevar un buen curso y suelen estar asociadas a una baja mortalidad.

La mayoría de las especies de *Acinetobacter* son ubicuas y, como se observa en la Tabla 1, se han aislado a partir de diversos nichos ecológicos, comprendiendo la piel humana (21) o el suelo y agua (22-25). La especie con mayor relevancia clínica dentro de este género es *A. baumannii*. Esta bacteria se ha manifestado como un patógeno sumamente importante debido al incremento de las infecciones nosocomiales que ha causado en los últimos 30 años, y a la propagación global de cepas portadoras de resistencias a múltiples antibióticos.

1.2. El patógeno *Acinetobacter baumannii*

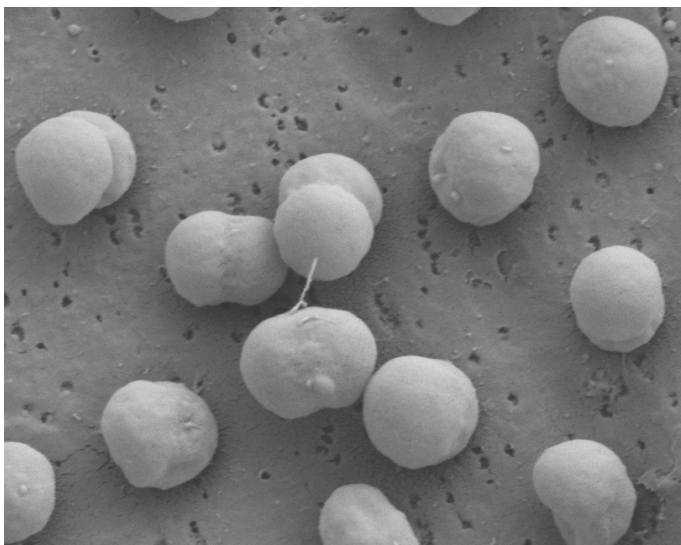


Figura 1. Imagen de microscopía electrónica de barrido (SEM) de la cepa clínica de *A. baumannii* AbH120-A2. Imagen tomada a 50.000 aumentos.

A. baumannii es la bacteria más conocida dentro del género *Acinetobacter*. Se trata de un cocobacilo Gram-negativo oportunista, no fermentador de glucosa y sin flagelo. Al contrario que otras especies del género *Acinetobacter*, frecuentemente aisladas del suelo, agua y animales (4, 22), *A. baumannii* se encuentra casi exclusivamente en ambientes hospitalarios, siendo responsable del 2-10 % de las infecciones

hospitalarias producidas por microorganismos Gram-negativos. La IDSA (*Infectious Diseases Society of America*) ha englobado a *A. baumannii* dentro de ESKAPE, siglas que representan a los microorganismos “más problemáticos” en hospitales de todo el mundo. *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Enterobacter*

especies (26) se engloban en este grupo dada su alto grado de morbilidad, mortalidad y costes sanitarios. *A. baumannii* tiene una elevada capacidad para sobrevivir y diseminarse rápidamente en el ambiente hospitalario. Es capaz de persistir largos períodos de tiempo en superficies y objetos inanimados y de adquirir mecanismos de resistencia a un amplio rango de compuestos antimicrobianos (27).

1.2.1. Importancia clínica de *Acinetobacter baumannii*

Cada vez son más frecuentes las infecciones hospitalarias producidas por *A. baumannii*. En muchas ocasiones, estas infecciones son causadas por cepas multirresistentes, afectando generalmente a individuos portadores de graves enfermedades subyacentes.

La infección nosocomial

Este patógeno humano es reconocido como el causante de una amplia gama de infecciones nosocomiales graves, tales como neumonía (asociada a la ventilación mecánica), bacteriemia, endocarditis, infecciones de piel y tejidos blandos, infecciones del tracto urinario y meningitis. Las manifestaciones clínicas más frecuentes son la neumonía asociada a ventilación mecánica y las bacteriemias (28, 29), ambas relacionadas con una alta morbilidad y mortalidad, entre el 40 y el 70 % de los casos, respectivamente. En la mayoría de los casos, se cree que las infecciones son adquiridas por el contacto con material hospitalario contaminado con *A. baumannii* o por contacto con el personal hospitalario que ha estado expuesto al microorganismo (5, 28, 29). Estas infecciones, además de estar asociadas a una alta mortalidad, conllevan un incremento de la estancia en el hospital de los pacientes, lo que se traduce en un incremento de los gastos médicos (30). Los factores de riesgo que predisponen a los pacientes a la colonización o infección con *A. baumannii* son similares a los que se han identificado para otros microorganismos MDR. Estos incluyen:

- factores del propio paciente: la cirugía previa, una herida traumática (en particular una quemadura), una enfermedad grave subyacente o bebés prematuros.
- factores relacionados con la exposición: el ingreso en UCI, estancia prolongada en el hospital, permanecer en un habitáculo con un *A. baumannii* endémico o presencia de equipos médicos contaminados.

- factores relacionados con tratamientos médicos: la ventilación mecánica, la presencia de dispositivos invasivos (catéteres intravasculares, catéteres urinarios o tubos de drenaje), el número de procedimientos invasivos realizados y la terapia previa antimicrobiana.

El estudio de los factores de riesgo asociados es importante para el desarrollo de medidas de prevención de la colonización e infección por este microorganismo.

La infección comunitaria.

Se reconoce a *A. baumannii* como una infrecuente pero importante causa de neumonía comunitaria. La mayoría de los casos están relacionados con otro tipo de enfermedades subyacentes, como el alcoholismo, el tabaquismo, el EPOC o la diabetes mellitus. Esto ha sido observado en regiones tropicales de Asia y Australia caracterizándose por tener un curso clínico fulminante, con infección secundaria del torrente sanguíneo y una elevada mortalidad (entre el 40 % y el 60 %). Otras formas de infecciones causadas por *A. baumannii* adquiridas en la comunidad son infrecuentes (28).

Dado que la infección por *A. baumannii* normalmente ocurre en pacientes críticos, la mortalidad asociada es alta. Estos pacientes a menudo presentan un mal pronóstico, siendo difícil determinar el verdadero impacto clínico de éste microorganismo, así como calcular la mortalidad atribuible a la infección independientemente de la gravedad de sus enfermedades subyacentes.

1.3. Métodos de identificación

Las especies que componen este género, crecen en medios de cultivo típicos tales como Columbia agar-sangre en condiciones de aerobiosis y a temperaturas de 37 °C. Bouvet y Grimont propusieron en 1986 un esquema de identificación fenotípica basado en 38 ensayos que posteriormente se amplió incluyendo pruebas de crecimiento a distintas temperaturas o distintas fuentes de carbono (31). Esta metodología es muy laboriosa y en la práctica clínica ya no se lleva a cabo.

Los métodos de identificación molecular son más exactos que los fenotípicos en la identificación de las distintas especies de *Acinetobacter* y han contribuido a una mejor

comprensión de la epidemiología y la importancia clínica de las especies del género durante los últimos años. Cabe mencionar que el uso de estas técnicas se limita a laboratorios de referencia.

Los métodos de identificación tradicional incluyen serotipado, ribotipado, ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (28), PFGE (*Pulse-Field Gel Electrophoresis*), métodos basados en ADN-repetitivo rep-PCR (*Repetitive Extragenic Palindromic Sequence-based Polymerase Chain Reaction*), AP-PCR (*Arbitrary Primer Sequence-based Polymerase Chain Reaction*) (32), RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) (33) y MLST (*Multilocus Sequence Typing*).

Otras técnicas de identificación genotípica, más modernas y rápidas, se basan en la creación de plataformas de identificación. El uso de la secuenciación masiva, PCR-ESI-MS (*PCR ligada a Electrospray Ionization Mass Spectrometry*) o métodos basados en proteómica, MALDI-TOF, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* (desorción/ionización por láser asistida por matriz) y TOF por el analizador *Time of Flight* (tiempo de vuelo) (34, 35) facilitan el trabajo diario en cuanto a coste y tiempo en un laboratorio de microbiología clínica.

La utilización de estas técnicas de identificación genotípica en cepas clínicas de *A. baumannii*, epidémicas y no epidémicas, nos ha permitido identificar linajes clonales diseminados por todo el mundo y responsables de brotes hospitalarios. Estudios actuales han identificado al menos 6 grupos ICL (*International Clonal Lineage*) distribuidos por todos los continentes. Dentro de estos grupos se engloban los Clones Europeos I, II y III (36).

1.4. Mecanismos de resistencia a antimicrobianos.

La resistencia a antimicrobianos entre las distintas especies de *Acinetobacter* y, en especial la de *A. baumannii*, se ha incrementado de manera sustancial en las últimas décadas, lo que supone un importante problema para el sistema sanitario, ya que compromete enormemente la capacidad para tratar a los pacientes infectados con este patógeno. Los casos descritos de infecciones producidas por cepas de *A. baumannii* pan-resistentes (cepas resistentes a todos los antibióticos usados en la clínica) son especialmente alarmantes (5).

Los principales mecanismos de resistencia a diferentes antibióticos identificados en *A. baumannii* se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Principales mecanismos de resistencia en *A. baumannii*, publicado por McConnell y col, 2014 (5).

Antibiótico	Mecanismo de resistencia	Ejemplos
β-lactámicos	Inactivación por enzimas	β-lactamasas: AmpC, TEM, VEB, PER, CTX-M, SHV, Carbapenemasas: OXA-23, -40, -51, -58, -143, -like, VIM, IMP, NDM-1, -2
	Disminución expresión porinas	<i>carO</i> , <i>omp</i> 33-36, <i>oprD</i> -like
	Alteración PBPs	PBP2
	Bombas de expulsión	AdeABC
Fluoroquinolonas	Modificación diana de unión	Mutaciones en <i>gyrA</i> y <i>parC</i>
	Bombas de expulsión	AdeABC, AdeM
	AMEs	AAC, ANT, APH
Aminoglucósidos	Bombas de expulsión	AdeABC, AdeM
	Metilación ribosomal	<i>armA</i>
Tetraciclinas	Bombas de expulsión	<i>AdeABC</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i>
	Protección ribosomal	<i>tetM</i>
Glicilclincinas	Bombas de expulsión	AdeABC
Polimixinas (Colistina)	Modificación diana de unión	Mutaciones en el sistema regulador de dos componentes PmrA/B (modificación de los LPS) Mutaciones en los genes de biosíntesis de LPS

El presente trabajo se centrará en los mecanismos de resistencia a antibióticos β-lactámicos.

1.4.1. Antibióticos β-lactámicos y mecanismos de resistencia

La importancia del descubrimiento de Alexander Fleming en 1928 del primer antibiótico de éxito terapéutico, producido por el hongo *Penicillium notatum*, significó el inicio de la edad de oro de los antimicrobianos.

Los antibióticos β -lactámicos constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos y más utilizada en la práctica clínica.

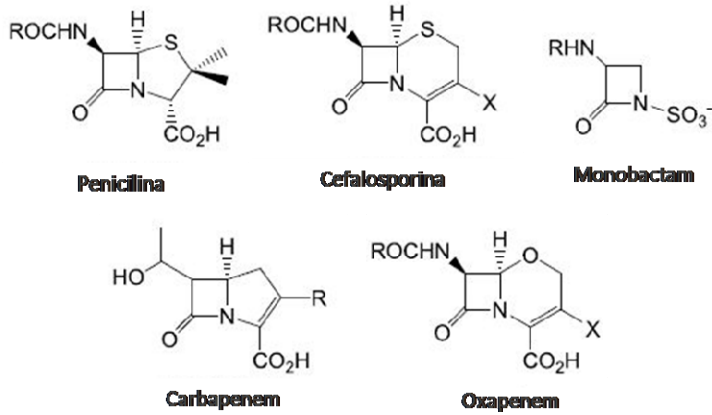


Figura 2. Esquema de los antibióticos β -lactámicos clínicamente más relevantes.

Los antibióticos β -lactámicos se caracterizan por tener un anillo β -lactámico, lo cual determina en gran medida sus características. Este anillo es esencial para que la molécula funcione a la perfección, pero por si solo carece de actividad antimicrobiana y necesita ser activado por otros radicales para poder unirse a sus receptores (proteínas fijadoras de la penicilina, PBPs). La naturaleza de los radicales esenciales que se unen al anillo β -lactámico define las diferentes clases de antibióticos β -lactámicos. Los anillos estructurales más frecuentes son dos: el anillo β -lactámico y otro en combinación (anillo secundario). De los anillos secundarios, depende gran parte de la actividad de estos antibióticos y su resistencia a las β -lactamasas. En la Figura 2 se muestran las estructuras de los principales antibióticos β -lactámicos: penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos, oxacilinas y carbapenemes.

Los antibióticos β -lactámicos son agentes bactericidas que producen su efecto a través de dos mecanismos: 1) inhibiendo o disminuyendo la formación de enlaces entre las cadenas de peptidoglicano (PG), afectando a la síntesis de la pared bacteriana y 2) induciendo la liberación de autolisinas que hacen que la bacteria acabe lisándose (37). Hay tres mecanismos principales a través de los cuales una bacteria se hace resistente a un agente antimicrobiano. Estos incluyen la producción de enzimas inactivadoras de antibióticos, la alteración de la diana del antimicrobiano y la disminución de la concentración de la droga en el interior de la célula mediante el control de la permeabilidad de membrana, modificando la expresión de proteínas de membrana, tales como porinas y bombas de expulsión (Figura 3). En ocasiones, estos mecanismos de resistencia a β -lactámicos pueden ir asociados a otros mecanismos causantes de la resistencia a otras familias de antibióticos (38).

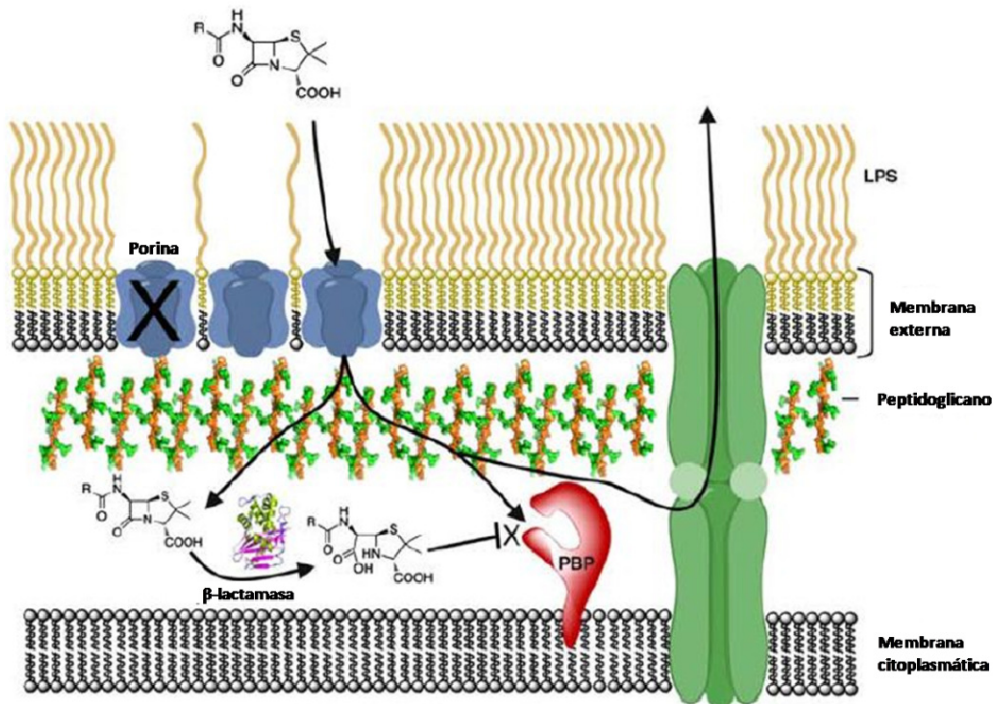


Figura 3. Esquema de la composición de la pared celular de las bacterias Gram-negativas y los diferentes mecanismos de resistencia a β -lactámicos. Figura adaptada de Llarrul y col. 2010.

1.4.1.1. Modificación de la diana del antimicrobiano.

Las alteraciones en las PBPs pueden conllevar una pérdida de afinidad por los β -lactámicos con la consiguiente disminución de su actividad (39). Estas proteínas se han denominado así por ser las dianas de las penicilinas y son indispensables para la formación e integridad de la pared bacteriana. La unión de los antimicrobianos a las PBPs causa la inhibición del crecimiento bacteriano, la inhibición de la división celular y la pérdida de la biosíntesis de muropéptidos de pared celular originando la lisis celular (39, 40). La información es limitada en cuanto al papel de la resistencia a β -lactámicos de las PBPs en *A. baumannii*, ya que afecta principalmente a cocos Gram-positivos.

Fernández-Cuenca y col. (2003) relacionaron una PBP de 73,2 KDa (PBP2a) con la resistencia a imipenem y meropenem, mientras que su total ausencia, junto con la modificación de otra PBP de 70,1 KDa (PBP2b) se asoció con niveles de resistencia más elevados en ambos compuestos (41). Más recientemente, Cayô y col. (2011) estudiaron las secuencias nucleotídicas de los genes que codifican PBPs en *A. baumannii* y analizaron sus variaciones alélicas en cepas sensibles y resistentes a β -lactámicos (42).

1.4.1.2. Control de la permeabilidad de membrana. Porinas y bombas de expulsión

Porinas

La porinas son proteínas de membrana que forman canales en la membrana bacteriana. Estos canales regulan la entrada de algunos elementos, generalmente compuestos hidrófilos y de pequeño tamaño y, entre ellos, la mayoría de los antibióticos β -lactámicos. Muchas bacterias han desarrollado estrategias de supervivencia como son las variaciones en la estructura de sus porinas o en la regulación de su expresión en respuesta a la presencia de antibióticos.

Poco se sabe sobre las porinas de *A. baumannii*. Su bajo número y pequeño tamaño explican su baja permeabilidad en comparación con otros patógenos Gram-negativos, lo cual implica una resistencia intrínseca a antibióticos (43). La porina más abundante y mejor conocida en *A. baumannii* es HMP-AB (proteína modificable por calor), hoy en día conocida como OmpA por su homología con la OMP-A de Enterobacteriaceae y con OMP-F de *Pseudomonas aeruginosa*.

Se ha demostrado que la reducción en la expresión de algunas porinas afecta a la resistencia a antibióticos β -lactámicos. Limansky y col. (2002) demostraron que la resistencia a imipenem estaba relacionada con la pérdida de una porina de 29 KDa, CarO (44). En otro trabajo se demostró que la pérdida de la porina Omp33-36, también estaba asociada a la resistencia a carbapenemes (45).

Bombas de expulsión

Las bombas de expulsión son mecanismos de expulsión de membrana que median la salida de compuestos tóxicos que podrían dañar la célula bacteriana. Entre las sustancias que son capaces de expulsar también se encuentran los antibióticos. La multirresistencia bacteriana a menudo está relacionada con un incremento en la expresión de las proteínas que componen las bombas de expulsión. Los antibióticos expulsados al exterior celular por las bombas tienen que cruzar la membrana externa poco permeable para volver a entrar en la célula. Es por ello que las bombas de expulsión trabajan sinérgicamente con la baja permeabilidad de la membrana externa (43).

En *A. baumannii* se han identificado sistemas de expulsión asociados a resistencia a antibióticos (generalmente macrólidos, tetraciclinas y quinolonas) pertenecientes a 4 superfamilias: RND, MATE, MFS y SMR (46). La bomba de expulsión AdeABC, perteneciente a la

superfamilia RND, es la mejor caracterizada en *A. baumannii*. Como todas las bombas de este tipo presenta una estructura formada por tres componentes: AdeB (componente transmembrana), AdeA (la proteína de fusión de la membrana interna), y AdeC (proteína de membrana externa). Los genes responsables de la bomba AdeABC se localizan en el cromosoma, y su expresión está regulada por un sistema de dos componentes (AdeRS) (46). Experimentos de inactivación con un aislado clínico que sobreexpresa la bomba AdeABC concluyeron que esta bomba confiere resistencia a aminoglucósidos, β -lactámicos (tales como cefepime o cefotaxime), fluoroquinolonas, tetraciclinas, tigeciclina, macrólidos, cloranfenicol y trimetropin. AdeIJK fue el segundo sistema RND descrito en *A. baumannii* y es capaz de expulsar β -lactámicos entre otros antibióticos, contribuyendo a su resistencia intrínseca (46).

1.4.1.3. Producción de β -lactamasas

La hidrólisis enzimática es el mecanismo de resistencia mayoritario frente a los antibióticos β -lactámicos en las bacterias Gram-negativas y esto se debe a la presencia de β -lactamasas en el espacio periplásmico. Las β -lactamasas son enzimas de carácter proteico, codificadas por un gen cuya localización puede ser cromosómica pero que, en ocasiones, puede estar presente en plásmidos y diseminarse a través de transposones. Su expresión puede ser inducible o constitutiva y son capaces de hidrolizar el anillo β -lactámico dejándolo inactivo.

Origen. Probablemente estas enzimas se han desarrollado como variantes de las propias enzimas biosintéticas de la pared celular: las transpeptidasas, transglicosidasas y carboxipeptidasas, que se conocen como las proteínas fijadoras de penicilinas (PBPs), las cuales son objeto del ataque de los β -lactámicos.

Clasificación. Las β -lactamasas se clasifican por la secuencia de sus aminoácidos, por su espectro de actividad, su peso molecular, su especificidad de sustrato y por su origen cromosómico o plasmídico. La clasificación más aceptada, por ser la más sencilla y menos controvertida, fue publicada por Ambler en 1980 y clasifica estas enzimas en cuatro clases según su estructura molecular: A, B, C y D (47). Otra clasificación bastante aceptada, es la publicada por Bush y Jacoby (48), más útil a nivel clínico y microbiológico.

– **β -lactamasas de clase A.** Junto con las de clase C y D, son enzimas serina-dependientes, presentando una serina en su sitio activo necesaria para catalizar la hidrólisis antibiótica. En este proceso se cataliza un acil-intermediario uniendo la serina del centro activo al anillo del antibiótico, haciéndolo así inactivo. Hidrolizan antibióticos como cefalosporinas de tercera y cuarta generación y aztreonam. Son inhibidas por ácido clavulánico y tazobactán.

Dentro de este grupo de β -lactamasas, están las denominadas β -lactamasas de Espectro Extendido (BLEE). Estas enzimas se localizan en integrones localizados en plásmidos y algunas de ellas son cromosómicas. Las más comunes dentro de *A. baumannii* son las β -lactamasas tipo PER, VEB y GES (49), aunque también se han descrito β -lactamasas tipo TEM, SHV, CTX-M y RTG, aunque con menor incidencia. Las β -lactamasas tipo KPC, que confieren resistencia a todos los antibióticos β -lactámicos, incluidos los carbapenemes, han sido descritas en *A. baumannii* en muy contadas ocasiones (50). Aunque son enzimas con una alta capacidad hidrolítica, su actividad puede ser enmascarada por la presencia de una β -lactamasa de clase C (AmpC) en su cromosoma, intrínseca en este género, lo que hace que sea difícil su detección y que no se sepa con certeza lo extendidas que están estas enzimas en *A. baumannii* (51).

– **β -lactamasas de clase B.** Las enzimas de este grupo se diferencian de las de los demás grupos por no ser enzimas serina-dependientes, requiriendo la presencia de iones metálicos para la ruptura del anillo β -lactámico. Se caracterizan por su potente actividad carbapenemasa, por ser inhibidas por agentes quelantes tipo EDTA y no por ácido clavulánico y por no hidrolizar monobactámicos (52, 53). Son quizás la clase menos frecuente en clínica pero, como ocurre con el resto de β -lactamasas, se aíslan cada vez con mayor frecuencia. Este tipo de β -lactamasas se encuentran frecuentemente localizadas en integrones de clase 1, formando parte de transposones, lo que les permite desplazarse con relativa facilidad de unas bacterias a otras. Las metallo- β -lactamasas con mayor relevancia clínica en *A. baumannii* son las tipo IMP, VIM, SIM y NDM (54). Los casos descritos referentes a las metallo- β -lactamasas NDM son recientes. Inicialmente estas metallo- β -lactamasas fueron descritas en *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* pero, rápidamente, se diseminaron a otras bacterias incluyendo *A. baumannii*. Actualmente representan una grave amenaza (55-57).

– **β -lactamasas de clase C.** Las β -lactamasas de clase C (AmpC) son enzimas cefalosporinasas, que hidrolizan penicilinas, cefamicinas y cefalosporinas (excepto cefepime). No son inhibidas por ácido clavulánico y no degradan carbapenemes. La mayoría de las

bacterias Gram-negativas portan en el cromosoma un gen *ampC* que expresan de manera inducible y, en algunas ocasiones, de manera constitutiva (49). La sobreexpresión de este gen está asociada a la inserción de una secuencia ISAb1 que le provee de una fuerte región promotora (58).

Estudios filogenéticos concluyen que los genes cromosómicos *ampC* de *Acinetobacter* spp. podrían descender de un ancestro común que codifica una β -lactamasa, de tal forma que dichos genes estarían más relacionados entre sí que con otros genes *ampC* de otras bacterias. Por ello, se ha propuesto que estos genes representen una nueva familia de β -lactamasas denominadas cefalosporinas derivadas de *Acinetobacter* (ADCs)(51).

– β -lactamasas de clase D. De manera histórica, se han denominado a las β -lactamasas de clase D como oxacilinasas porque las primeras que se describieron hidrolizaban con mayor facilidad oxacilina que las penicilinas clásicas. A ello se debe la designación de OXA para las enzimas de clase D. Además hidrolizan amoxicilina, meticilina, cefaloridina, aunque también existen las de espectro extendido. Son resistentes a los inhibidores clásicos. Por el contrario, la actividad carbapenemasa parece no ser una propiedad intrínseca de algunas oxacilinasas. Por ello, se pueden diferenciar dos tipos de β -lactamasas de clase D: enzimas tipo OXA no carbapenemasas y enzimas tipo OXA carbapenemasas. Hasta la fecha, han sido descritas 496 β -lactamasas de clase D (<http://www.lahey.org/Studies/>).

Las primeras enzimas tipo OXA no carbapenemasa descritas fueron la OXA-1, la OXA-2 y la OXA-3 (6), seguidas de las β -lactamasas tipo OXA de espectro extendido, cuyo representante es la OXA-10. Estas β -lactamasas hidrolizan mejor las cefalosporinas de tercera generación y han sido descritas en *Pseudomonas aeruginosa* (59, 60). Solo una, la OXA-21, ha sido descrita en *A. baumannii* en una ocasión (61).

Hasta hace escasos años, las β -lactamasas de clase D carbapenemasas se dividían en cuatro *clusters*: OXA-23, OXA-24, OXA-51 y OXA-58. Recientemente, a esos cuatro *clusters* se le ha sumado un quinto representado por la OXA-143, y otros sub-*clusters* de β -lactamasas tipo OXA, los cuales están representados en la Tabla 3.

Tabla 3. Enzimas tipo OXA-carbapenemasas, descrito por Evans y Amyes, 2014 (6).

Enzimas	Nº enzimas del grupo	Localización	Especies hospedadoras	
OXA-23	OXA-23, OXA-27, OXA-49, OXA-73,	19	C/P	<i>A. baumannii</i> , <i>A. junii</i> , <i>A. radioresistens</i> , <i>A.</i>

	OXA-102, OXA-103, OXA-105, OXA-133, OXA-134, OXA-146, OXA-165–OXA-171, OXA-225, OXA-239				<i>pittii</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>A. phenon 5</i> , <i>A. phenon 6/ct 13TU</i> , <i>A. nosocomialis</i> , <i>Acinetobacter genomic species 10/11</i> , <i>A. Iwoffii</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>A. baylyi</i>
OXA-24	OXA-40, OXA-25, OXA-26, OXA-72, OXA-139, OXA-160, OXA-207	7	C/P		<i>A. baumannii</i> , <i>A. haemolyticus</i> , <i>A. pittii</i> , <i>A. baylyi</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>A. calcoaceticus</i> , <i>K. pneumoniae</i>
OXA-51	OXA-51, OXA-64–OXA-71, OXA-75–OXA-80, OXA-82–OXA-84, OXA-86–OXA-95, OXA-98–OXA-100, OXA-104, OXA-106–OXA-113, OXA-115–OXA-117, OXA-120–OXA-128, OXA-130–OXA-132, OXA-138, OXA-144, OXA-148–OXA-150, OXA-172–OXA-180, OXA-194–OXA-197, OXA-200–OXA-203, OXA-206, OXA-208, OXA-216, OXA-217, OXA-219, OXA-223, OXA-241, OXA-242, OXA-248–OXA-250, OXA-254	89	C/P		<i>A. baumannii</i> , <i>A. nosocomialis</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>K. pneumoniae</i>
OXA-58	OXA-58, OXA-96, OXA-97, OXA-164	4	C/P		<i>A. baumannii</i> , <i>A. pittii</i> , <i>A. nosocomialis</i> , <i>Acinetobacter phenon 6/ct 13TU</i> , <i>A. junii</i> , <i>Acinetobacter genomic species 9</i> , <i>A. bereziniae</i> , <i>A. calcoaceticus</i> , <i>A. radioresistens</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>Comamonas testosteroni</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>Delftia acidovorans</i>
OXA-134a	OXA-134a, OXA-186–OXA-191	7	C		<i>A. Iwoffii</i> , <i>A. schindleri</i>
OXA-143	OXA-143, OXA-182, OXA-231, OXA-253, OXA-255	5	P		<i>A. baumannii</i> , <i>A. pittii</i>
OXA-213	OXA-213	17	C		<i>A. calcoaceticus</i> ,
OXA-214	OXA-214, OXA-215	5	C		<i>A. haemolyticus</i>
OXA-211	OXA-211, OXA-212, OXA-309	6	C		<i>A. johnsonii</i>
OXA-229	OXA-228–OXA-230, OXA-257	8	C		<i>A. bereziniae</i>
OXA-235	OXA-235–OXA-237, OXA-278	7	C/P		<i>A. schindleri</i> , <i>A. baumannii</i>
OXA-48	OXA-48, OXA-48b, OXA-162, OXA-163, OXA-181, OXA-199, OXA-204, OXA-232, OXA-244, OXA-245, OXA-247	11	C/P		<i>E. cloacae</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>Shewanella xiamenensis</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Providencia rettgeri</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Enterobacter sakazakii</i> , <i>A. baumannii</i>

C, cromosómica; P, plasmídica

Algunas de estas OXAs se describen a continuación:

β-lactamasas tipo OXA-23. La primera enzima tipo OXA carbapenemasa descrita fue la enzima ARI-1, hoy conocida como OXA-23. Fue aislada de un paciente en Edimburgo en 1985, curiosamente coincidiendo con el año en que es aprobado el uso del imipenem como tratamiento clínico (6, 62). Han sido descritos múltiples brotes hospitalarios producidos por *A. baumannii* portador de OXA-23. De hecho, a día de hoy, se trata de la carbapenemasa más frecuente en *A. baumannii* y está diseminada por el mundo (54). Puede estar codificada en plásmidos o en el cromosoma y, en ciertos casos, se encontró localizada en los transposones Tn2006, Tn2007 y Tn2008 (63-65).

β-lactamasas tipo OXA-24. El segundo grupo de enzimas tipo OXA carbapenemasas en *A. baumannii* es el representado por la OXA-24 (también nombrada como OXA-40). Esta enzima fue identificada por Bou y col. (1997), a partir de aislados que formaban parte de un brote hospitalario (66). Santillana y col. (2007), resolvieron la estructura cristalográfica de la OXA-24, siendo los primeros en identificar el puente hidrofóbico formado por la tirosina 112 y la metionina 223. Realizando mutagénesis dirigida en estas posiciones aminoacídicas se demostró que estos residuos eran los responsables de la orientación de los carbapenemes en el sitio activo. En cuanto a parámetros cinéticos, estas β-lactamasas presentan actividad frente a penicilinas, cefalosporinas y carbapenemes (más por el meropenem que por el imipenem) (67). Bou y col. (2010), describieron un posible inhibidor que podría funcionar contra aislados de *A. baumannii* productores de OXA-24 (68). Las enzimas de este grupo son siempre plasmídicas y se trata de las β-lactamasas más diseminada en USA, España y Portugal (54).

β-lactamasas tipo OXA-51. Es el grupo más abundante de β-lactamasas de clase D. La primera β-lactamasa descrita de este tipo fue la OXA-51, aislada de una cepa de *A. baumannii* en Argentina (69). Estas β-lactamasas son intrínsecas de *A. baumannii* y se han encontrado 95 variantes en el cromosoma (6). Su expresión varía de acuerdo con la presencia/ausencia de la secuencia de inserción IS*Aba*1 en la región promotora (70). Hidrolizan débilmente imipenem y meropenem pero cuando se realizan experimentos *in vivo*, la CMI a estos antibióticos carbapenémicos se incrementa drásticamente (6).

β -lactamasas tipo OXA-58. El primer miembro descrito de este grupo se identificó en Francia en 2003 en una cepa clínica de *A. baumannii* multirresistente que presentaba resistencia a los carbapenemes. Tienen actividad hidrolítica frente a penicilinas, cefalosporinas de primera y segunda generación y débilmente frente a carbapenemes (71). Sólo han sido descritas tres variantes de este grupo: OXA-96, OXA-97 y OXA-164 (72, 73). Todas son plasmídicas y están asociadas con secuencias de inserción.

β -lactamasas tipo OXA-143. Este grupo de enzimas fue descrito recientemente por Higgins y col. (2009). Hidroliza penicilinas, oxacilina, meropenem, imipenem pero no cefalosporinas de espectro-extendido. Su localización es plasmídica y no está asociado a secuencias de inserción ni integrones (74).

β -lactamasas tipo OXA-134a. Este grupo de β -lactamasas no ha sido descrito en *A. baumannii* sino que son intrínsecas de *A. lwoffii*. Los genes responsables no parecen estar muy expresados ya que los aislados no son resistentes a los β -lactámicos. Sin embargo, cuando estos genes fueron clonados y expresados en *E. coli* se vio reducida la sensibilidad a los carbapenemes y cefalosporinas, y se convirtieron en cepas resistentes a penicilinas (75).

β -lactamasas tipo OXA-48. Este grupo de β -lactamasas fue descrito por primera vez en un aislado de *K. pneumoniae* en 2001 en Turquía. Rápidamente se diseminó por todo el mundo y en el año 2013 se detectó el primer caso en *A. baumannii* en el norte de Portugal (6). Su localización es plasmídica e hidroliza penicilinas e imipenem pero no cefalosporinas de espectro-extendido.

β -lactamasas tipo OXA-235. Un nuevo grupo de β -lactamasas tipo OXA es el representado por la OXA-235. Esta β -lactamasa fue aislada en cepas de *A. baumannii* en USA y México (76). Hidrolizan penicilinas y carbapenemes, pero no tienen actividad hidrolítica frente a cefalosporinas de amplio espectro. Este subgrupo incluye la OXA-235, la OXA-236 y la OXA-237. Los correspondientes genes se localizan en plásmidos y están flanqueados por dos copias de ISAb_a1 (49).

Diseminación de β -lactamasas en *A. baumannii*.

La capacidad para adquirir, retener y diseminar múltiples mecanismos de resistencia es una de las características que define a *A. baumannii*. Esto es debido a que los genes de resistencia son transferidos de forma horizontal a través de elementos móviles entre diferentes cepas, entre diferentes especies e incluso entre diferentes familias de bacterias. En la literatura aparecen múltiples casos de β -lactamasas identificadas en una especie bacteriana y que rápidamente son diseminadas a otras especies. Un ejemplo es el caso de la β -lactamasa OXA-48 o el de la metallo- β -lactamasa NDM. Los elementos a través de los cuales se diseminan las β -lactamasas se detallan a continuación.

Secuencias de inserción.

Las secuencias de inserción (IS) son elementos genéticos pequeños (< 2.5 Kb) constituidos por secuencias de ADN que codifican la síntesis de una transposasa y están flanqueadas por secuencias repetidas e invertidas (IRL e IRR). "ISfinder" es una base de datos (<https://www-is.biotoul.fr/>) donde se muestra la gran diversidad de IS, su distribución y ubicuidad en plásmidos y genomas secuenciados (77).

Las IS son los mecanismos más frecuentes relacionados con la diseminación y sobreexpresión de las β -lactamasas tipo OXA. Más de 30 IS diferentes han sido descritas en *A. baumannii*, siendo la más prevalente IS*Aba1*, descrita por Corvec y col. (78). La transposasa IS*Aba1* está formada por dos genes superpuestos que requieren un movimiento en pauta para codificar la transposasa funcional (79). IS*Aba1* ha sido identificada en relación con los genes *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58-like}, y *bla*_{OXA-235-like}. Cuando esta IS se encuentra en el extremo 5' del gen le puede conferir una secuencia promotora que hace que se incremente su expresión. Además, esta secuencia de inserción también está implicada en la movilización de genes tipo OXA. Un ejemplo, es el transposón Tn2006, que contiene dos copias de IS en dirección opuesta flanqueando a la β -lactamasa OXA-23 (63). IS*Aba3* es otra secuencia de inserción relacionada con β -lactamasas tipo OXA, generalmente con *bla*_{OXA-58-like}. Se localizan una en el extremo 5' del gen y otra en el extremo 3', formando un transposón compuesto (80).

Los ISCRs son un inusual tipo de secuencia de inserción que presentan semejanzas con la familia IS91 tanto en estructura como en función. A menudo se encuentran en integrones de clase I, se caracterizan porque carecen de secuencias repetidas invertidas (IRL y IRR) y se transpone mediante un "modelo de replicación en círculo rodante" (81).

Sistemas de recombinación XerC/XerD.

Las β -lactamasas tipo OXA del grupo de la OXA-24 no se encuentran asociadas a secuencias de inserción. Se ha visto que el gen *bla*_{OXA-24} y otros genes del mismo grupo, se encuentran flanqueados por unas secuencias repetidas invertidas (XerC-6pb-XerD) (82, 83). Estas secuencias constituirían la diana sobre la que actuarían las recombinasas cromosómicas XerC y XerD. En un plásmido de 11 Kb que contenía dos copias del gen *bla*_{OXA-72}, β -lactamasa del mismo grupo que la OXA-24, ambas copias estaban flanqueadas por las secuencias XerC/XerD (84).

Transposones.

Los transposones son segmentos de ADN de mayor tamaño que las IS, capaces de insertarse en múltiples lugares del ADN diana. Contienen un gen que codifica una transposasa, responsable de su movilización, y uno o varios genes entre los que se encuentran genes de resistencia a antibióticos.

Integrones.

Los integrones son elementos genéticos que contienen un sistema de recombinación sitio-específica que reconoce y captura genes en *cassettes*, generalmente genes de resistencia a antibióticos o desinfectantes. La estructura básica de un integrón contiene un gen *int*, que codifica una integrasa, un sitio primario de recombinación (*attI*) y un promotor (*Pc*) que asegura la expresión de los genes del *cassette* incorporados en la región variable. Se han descrito una gran variedad de genes *cassette*. Su localización y su número es muy variable (85). Han sido descritos tres clases de integrones en *A. baumannii*, siendo los de la clase 1, asociados con el gen *sul1*, y los de la clase 2, asociados con el transposón Tn7, y sus derivados, los más frecuentes (86, 87).

Plásmidos.

Los plásmidos son moléculas autorreplicativas de ADN cromosómico que se componen de una región constante, que contiene los genes de sus funciones esenciales como la replicación, el mantenimiento y la transferencia, y una región variable donde se localizan los genes responsables de funciones adaptativas. Los genes que contienen no son imprescindibles para la supervivencia de la bacteria pero les confieren ventajas adaptativas. Los plásmidos

clásicos son circulares y de doble cadena, y su tamaño varía desde una hasta varios cientos de Kb.

La mayoría de las β -lactamasas tipo OXA han sido identificadas en plásmidos, con excepción de las OXAs intrínsecas de *Acinetobacter* spp. En *A. baumannii* estos plásmidos son muchos y variados en tamaño y contenido genético, pudiendo ser clasificados en base a la secuencia del gen que codifica la replicasa (88). En contraste con el número variado de plásmidos que albergan las distintas β -lactamasas tipo OXA, el gen *bla*_{OXA-48} ha sido descrito en un único plásmido (89).

Islas de resistencia.

Las islas de resistencia son regiones específicas del cromosoma bacteriano donde se encuentran un amplio número de secuencias de ADN transferido horizontalmente, incluyendo genes de resistencia. Normalmente, estas secuencias de ADN están insertadas en un mismo locus en el cromosoma de *A. baumannii*, empaquetadas en elementos genéticos móviles (IS, transposones e integrones) (90). Se cree que estas islas de resistencia emergieron a partir de la integración en el genoma de plásmidos u otros elementos móviles. Las cepas sensibles a antibióticos carecen de estas islas de resistencia (91).

AbaR1 fue la primera isla de resistencia descrita en una cepa multirresistente *A. baumannii* AYE. Insertada en el locus *comM*, AbaR1 comprendía una región de 86 Kb en la que fueron descritos 45 genes de resistencia a antibióticos y metales pesados. AbaR1 se encuentra flanqueada en ambos extremos por dos genes relacionados con la transposición(92).

1.5. Mecanismos de intercambio genético. Transferencia de genes de resistencia.

En las bacterias Gram-negativas se han descrito cuatro formas de intercambio de material genético: conjugación, transducción, transformación (2) y a través de vesículas de membrana externa (OMV) (Figura. 5).

1.5.1. Transformación.

La transformación consiste en la adquisición de ADN libre presente en el ambiente. Una vez dentro de la bacteria, el ADN podrá mantenerse como tal cuando se trate de un elemento autónomo, o bien integrarse en el genoma del huésped por recombinación. Para que este proceso tenga lugar, es necesario que las células sean competentes, entendiendo el

estado de competencia como aquel en el que las células permiten que el ADN se una a su superficie y penetre en el interior de la célula favoreciendo la adquisición de nuevos genes. En la naturaleza, la eficiencia de la transformación depende de la existencia de proteínas de membrana que permitan la incorporación de ADN al interior celular.

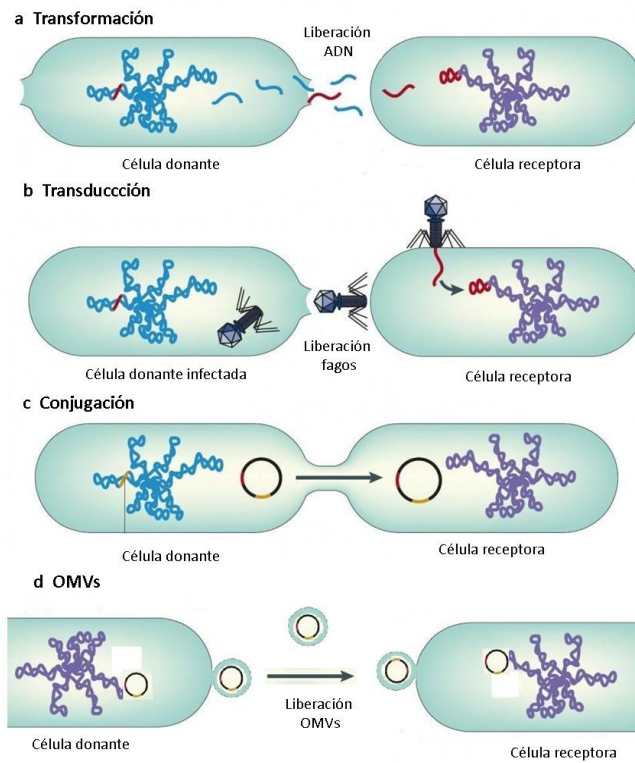


Figura 4: Mecanismos de intercambio genético en bacterias Gram-negativas. Imagen modificada de Furuya & Lowy, 2006.

1.5.2. Transducción.

Durante la transducción un bacteriófago transfiere los genes entre bacterias compatibles. Éste es el método más restringido, ya que la interacción entre el bacteriófago y el receptor bacteriano va a ser específica. Clínicamente este tipo de transmisión sólo tiene importancia en cocos Gram-positivos.

1.5.3. Conjugación.

La conjugación es la vía principal de diseminación de genes de resistencia entre las poblaciones bacterianas. Éste es el principal mecanismo de intercambio genético

ente bacterias Gram-negativas. Para que se produzca, es imprescindible que las bacterias estén en contacto directo entre sí y, por lo tanto, es muy frecuente que ocurra entre bacterias que comparten nicho ecológico. Durante este proceso, en las bacterias Gram-negativas interviene un “pilus conjugativo” a través del cual se produce el intercambio de material genético (93).

1.5.4. Transmisión a través de vesículas de membrana.

Este mecanismo de intercambio genético es el más novedoso. Las OMVs son estructuras esféricas secretadas de forma natural por todas las bacterias Gram-negativas. Clásicamente estas vesículas están formadas a partir de la membrana externa, por lo que están compuestas principalmente por proteínas de membrana externa, proteínas periplásmicas y lipopolisacáridos, aunque también contienen material citoplasmático y proteínas de

membrana interna. Recientemente, Pérez-cruz y col. (2015), demostraron que también existen vesículas de membrana interna-externa (94), lo que explicaría la presencia de material citoplasmático y proteínas de membrana interna. En su interior transportan lípidos y proteínas y también son capaces de transportar ADN y ARN. Se han descrito casos de transferencia de genes a través de vesículas en bacterias (95) tales como *E. coli* (96) o bacterias del rumen (97).

En el caso del género *Acinetobacter*, se ha descrito la transferencia horizontal de genes a través de estos cuatro mecanismos (98-100). Rumbo y col. (2011), demostraron que las OMVs de *A. baumannii* actuaban como vehículo de diseminación de genes de resistencia a carbapenemes (101).

1.6. Patogénesis y factores de virulencia en *A. baumannii*.

Las bacterias patógenas son capaces de colonizar, invadir y dañar al huésped para causar enfermedad (102).

En el pasado, *A. baumannii* fue considerado un organismo poco virulento. Por ello, a pesar del incremento en los últimos años de las infecciones producidas por *A. baumannii*, se conoce relativamente poco sobre los factores que contribuyen a su patogénesis. En los últimos años, estudios que combinan análisis genómicos, proteómicos, transcriptómicos o modelos de infección animal han ayudado a la identificación de fenotipos o factores de virulencia que participan en la patogénesis de *A. baumannii* (103). Durante el proceso de patogénesis de *A. baumannii* se requieren múltiples factores de virulencia. Estos mecanismos permiten a la bacteria colonizar y/o infectar al huésped de manera eficiente.

Dado el carácter multirresistente de esta especie y la escasez de tratamientos de los que se disponen para combatir las infecciones producidas por *A. baumannii*, es importante identificar nuevos factores de virulencia y profundizar en el conocimiento de la patogénesis de esta bacteria para así poder identificar nuevas dianas terapéuticas que permitan el control de las infecciones (90).

1.6.1. Factores de virulencia relacionados con adherencia.

A. baumannii tiene una capacidad intrínseca de interactuar con diferentes tipos de superficies y de adherirse a ellas. Esta capacidad es la que le permite colonizar diverso material

hospitalario, como catéteres o aparatos de ventilación mecánica, facilitando las infecciones nosocomiales. Además de superficies inertes, también es capaz de adherirse a superficies animadas como, por ejemplo, a células epiteliales humanas.

Un paso crítico en la colonización de tejidos es la adherencia a células eucariotas, siendo el primer paso para el desarrollo de la infección. El grado de adherencia de *A. baumannii* es variable entre diferentes aislados clínicos. Incluso, dentro de una misma cepa, el grado de adherencia a superficies inertes puede variar con respecto al grado de adherencia a superficies vivas. Por ello, se ha sugerido que *A. baumannii* tiene mecanismos moleculares independientes para la adherencia a distintas superficies (104).

En contraste con la habilidad adherente a las superficies abióticas de *A. baumannii*, muy poco se conoce sobre los factores que participan en la adherencia y formación de biofilm en superficies bióticas. *A. baumannii* se adhiere a células epiteliales humanas y a los filamentos de *Candida albicans* en un proceso en el que participa al menos la proteína de membrana externa OmpA (105).

El sistema de secreción tipo V (T5SS)

El sistema de secreción tipo V juega un importante papel en el proceso de patogénesis bacteriana, estando implicado en la translocación de adhesinas, enzimas, toxinas y otros factores de virulencia a través de las membranas (106, 107). Se ha identificado en un importante número de bacterias patógenas. Este sistema, conocido por su aparente simplicidad, puede funcionar mediante dos mecanismos diferentes: los autotransportadores (ATs) y los sistemas de dos componentes (TPS, *Two-Partner Secretion*). Ambos mecanismos se dedican a la traslocación de grandes proteínas o dominios de las proteínas a la superficie celular bacteriana.

Los ATs, autotransportadores, son una familia de largas proteínas que contienen un dominio C-terminal capaz de formar una estructura de β -barril permitiendo transportar el dominio N-terminal a la superficie celular bacteriana. Bentancor y col. (2012), describieron este tipo de adhesinas en una cepa de *A. baumannii* ATCC 17978. Ata (*Acinetobacter Trimeric Autotransporter*) participa en la adherencia a superficies bióticas y abióticas, y en la formación de biofilm en *A. baumannii* ATCC 17978 (108).

Los TPS, sistemas de secreción de dos componentes, están compuestos por dos proteínas separadas: TpsA, que es la proteína transportada al exterior celular y TpsB, que es el

transportador de membrana externa. Los genes que codifican las proteínas TpsA y TpsB están organizados en un operón, donde el gen *tpsB* generalmente precede al gen *tpsA*. El dominio POTRA (*Periplasmic Polypeptide Transport-Associated*) de la proteínas transportadora se une al dominio TPS de la proteína TpsA, traslocándola a la superficie bacteriana (Figura 5).

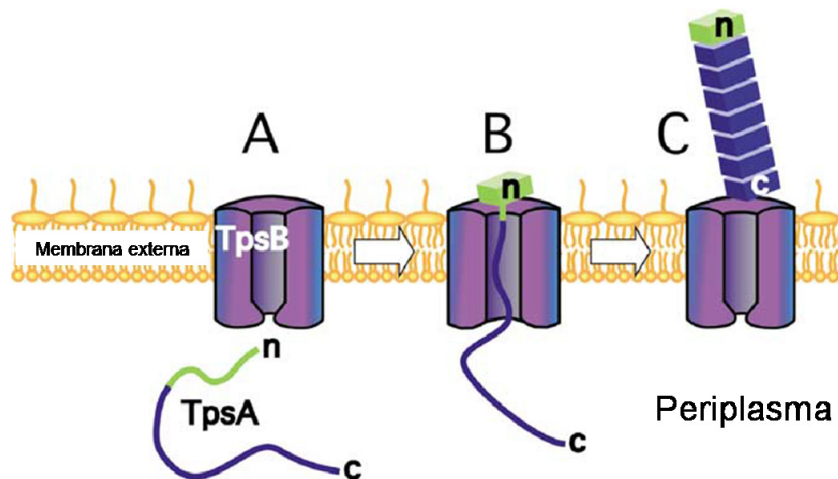


Figura 5. Modelo de secreción a través de la vía TPS (figura modificada de Thanassi y col. (2005).

Ejemplos bien estudiados en otras bacterias Gram-negativas son la *adhesine filamentous hemagglutinin* (FHA) de *Bordetella pertusis* o el sistema haemolítico ShlA/B de *Serratia marcescens*. En *A. baumannii*, Darvish y col. (2014), describieron en una cepa de *A. baumannii* ATCC 19606^T un sistema similar al descrito en *Bordetella pertusis*, FHA, el cual está implicado en adherencia a células eucariotas. Además, se ha descrito que estas proteínas que participan en la adherencia son muy inmunogénicas, por lo que serían buenos candidatos para la producción de vacunas (109).

1.6.2. Factores de virulencia relacionados con la formación de biofilm.

Generalmente, la adherencia de *A. baumannii* a superficies bióticas y abióticas tiene como resultado el desarrollo de biofilm. El biofilm es un complejo multicelular de estructura tridimensional formado por células bacterianas en contacto íntimo, embebidas en una matriz extracelular producida por ellas mismas. Esta matriz está compuesta por exopolisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y otras macromoléculas (90). El biofilm confiere a las bacterias un mecanismo protector que les permite sobrevivir en ambientes hostiles y durante la infección.

Por tanto, la habilidad para generar biofilm representa un importante factor de virulencia. Rumbo-Feal y col. (2013), realizaron un análisis transcriptómico de células planctónicas y células de biofilm en *A. baumannii* ATCC 17978. Este estudio reveló la sobreexpresión de 1621 genes en células formadoras de biofilm con respecto a células planctónicas y 55 genes únicamente expresados en biofilm y reprimidos en células planctónicas (110).

Hasta la fecha, se ha demostrado que ciertos genes están implicados en formación de biofilm en *A. baumannii*. Así, el sistema formador de pili tipo I, representado por CsuA/BABCDE, es esencial para la adherencia y formación de biofilm en superficies abióticas (111) pero no para la adherencia a superficies bióticas (112). La proteína de membrana externa de 854-kDa, proteína homóloga de BAP (*staphylococcal Biofilm-Associated Protein*) participa en el desarrollo del biofilm maduro. Se demostró que mutaciones del gene que codifica esta proteína tienen como resultado un menor volumen y espesor de biofilm formado sobre cristal (113). También, se demostró que la proteína de membrana externa OmpA descrita en *A. baumannii* participa en la formación de biofilm en superficies plásticas, y que es esencial para la adherencia a células epiteliales A549 (105).

1.6.3. Factores de virulencia relacionados con motilidad.

Históricamente, *A. baumannii* se ha descrito como un microorganismo inmóvil, ya que carece de flagelo. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que *A. baumannii* tiene motilidad tipo *twitching* (114, 115), lo cual podría estar relacionado con su capacidad para diseminarse rápidamente sobre superficies en general, proceso ya descrito con anterioridad en *A. calcoaceticus* (116). La motilidad tipo *twitching* está mediada por la extensión/retracción de los pili tipo IV, en el que participan un larguísimo número de genes. Eijkelkamp y col. (2011), realizaron un análisis comparativo de las secuencias de los genes que codifican pili tipo IV en distintas cepas de *A. baumannii* afirmando su papel en motilidad. También demostraron una correlación positiva entre el grado de conservación del gen que codifica la subunidad PilA y el fenotipo de motilidad exhibido. La motilidad tipo *twitching* también está controlada por la luz azul (117).

1.6.4. Factores de virulencia relacionados con polisacáridos de superficie.

Los polisacáridos de superficie (LPS) son considerados importantes factores de virulencia en las bacterias Gram-negativas (118). El LPS de *A. baumannii* está formado por una fracción de lípido A, un núcleo carbohidrato y una región variable formada por el antígeno-O. Se ha demostrado que el LPS activa la respuesta inmune innata. Se vio que mutantes que carecían de la glicosiltransferasa LpsB presentaron una disminución de su resistencia al suero humano y un descenso en la supervivencia usando modelos de infección en ratón (119). Beceiro y col. (2014), demostraron que modificaciones en el lípido A asociadas con resistencia a colistina, afectan negativamente a la fitness y a la virulencia (120).

Por otra parte, los polisacáridos capsulares hacen a la bacteria más hidrofílica y bloquean el acceso del complemento a la pared celular microbiana ejerciendo un papel protector frente a la respuesta inmune. Russo y col. (2010) trabajaron con cepas defectivas para los genes *ptk* o *epsA* (genes implicados en la formación de la cápsula bacteriana). Comprobaron que estas cepas presentaron una reducción en el crecimiento en suero humano y líquido ascítico, y una menor persistencia en modelos de infección en rata (121).

1.6.5. Factores de virulencia relacionados con permeabilidad de membrana.

Las proteínas de membrana externa (OMPs) se han relacionado con resistencia a antibióticos, adaptación y patogénesis. La porina OmpA es una de las proteínas de la superficie de *A. baumannii* más estudiadas. Se ha visto que es capaz de causar apoptosis y citotoxicidad dañando las mitocondrias y el núcleo en células eucariotas (122). Esta proteína se moviliza a través de vesículas de membrana externa a través de las cuales accede a las células eucariotas y ejerce su acción citotóxica (123). Además está implicada en adherencia a células eucariotas e interviene en la formación de biofilm (124). Fernández-Cuenca y col. (2011), demostraron que la atenuación de la virulencia de una cepa pan-resistente de *A. baumannii* se debía a la menor expresión de las porinas CarO y OprD-like (125). Otra OMP implicada en virulencia descrita recientemente es la Omp33-36. Rumbo y col. (2014), demostraron que la porina Omp33-36 induce apoptosis en células eucariotas (126) y Smani y col. (2013), demostraron su implicación en fitness y virulencia (127).

1.6.6. Factores de virulencia relacionados con las vesículas de membrana externa (OMVs).

Las OMVs son vesículas secretadas por bacterias Gram-negativas durante su fase de crecimiento. Se componen de proteínas de la membrana externa y periplasma, fosfolípidos y lipopolisacáridos. Las OMVs participan en el proceso de patogénesis de la bacteria ya que se ha descrito que llevan factores de virulencia al interior de la célula huésped. Además, las OMVs protegen a la bacteria de la respuesta inmune del huésped (128). Méndez y col. (2012), mediante el estudio proteómico del secretoma de una cepa de *A. baumannii*, identificaron 39 proteínas, presentes en la fracción proteica de las OMVs relacionadas con patogénesis y virulencia (129), tales como OmpA, hemolisinas o proteasas.

1.6.7. Factores de virulencia relacionados con la producción de enzimas hidrolíticas.

En el genoma de *A. baumannii* se han detectado genes que codifican enzimas lipolíticas: fosfolipasas C y D. Estos dos tipos de enzimas contribuyen a la patogénesis, degradando los fosfolípidos de las barreras mucosas de las células eucariotas. La síntesis de fosfolipasa C produce un aumento de la citotoxicidad en células eucariotas y la fosfolipasa D es crucial para la resistencia al suero humano, la invasión de células epiteliales y la patogénesis en modelos animales (130, 131).

1.6.8. Factores de virulencia relacionados con las proteínas de unión a la penicilina (PBPs).

Las PBPs son enzimas relacionadas con la biosíntesis del peptidoglicano (componente principal de la pared bacteriana), y se asocian con procesos de morfogénesis celular y división celular. Se ha visto que las mutaciones en el gen *pbpG* que codifica la PBP7/8 (proteína que participa en la división celular) implican una reducción en la resistencia al suero y en la virulencia en modelos de infección en animales (132). Russo y col. (2010), demostraron que esta PBP contribuye directa o indirectamente a la resistencia bacteriana en suero humano.

1.6.9. Factores de virulencia relacionados con el transporte de hierro.

El hierro es esencial para el crecimiento y supervivencia tanto del hospedador humano como de las bacterias. En el hospedador humano se mantiene a bajos niveles para evitar daño oxidativo, siendo secuestrado por proteínas transportadoras de alta afinidad (ferritina, transferrina, lactoferrina y hemoglobina). La bacteria lisa los eritrocitos (fosfolipasa C, hemolisina) para liberar el grupo hemo y extraer el hierro de su núcleo a través de los sistemas de captación de hierro especializados. Antunes y col. (2011), realizando estudios comparativos de genomas de *A. baumannii*, identificaron seis *clusters* de genes que codifican productos cuya función es la captura de hierro, entre ellos el sistema Feo homólogo al descrito en *E. coli* presente en todas las cepas estudiadas y el sideróforo acinetobactina (133).

Los sideróforos son compuestos quelantes de hierro secretados por bacterias. El sideróforo mejor estudiado en *A. baumannii* es la acinetobactina (134-136). La acinetobactina fue descrita por primera vez en la cepa de *A. baumannii* ATCC 19606^T y se ha encontrado en la mayoría de genomas secuenciados de *A. baumannii*. Estudios recientes han demostrado que el gen que media la producción de acinetobactina es indispensable para la persistencia y la capacidad de causar citotoxicidad de esta cepa, así como para causar muerte utilizando modelos animales, por lo que desarrolla un papel crucial en virulencia (137).

1.6.10. Factores de virulencia relacionados con el quorum sensing.

El quorum sensing (QS) es un mecanismo de comunicación bacteriana *cell-to-cell*, que se basa en la producción, detección y respuesta a una moléculas señales llamadas autoinductores. En *A. baumannii* las moléculas descritas de este tipo son las N-acil homoserin lactonas (AHL), las cuales son sintetizadas por una AHL sintasa y se unen a un receptor homólogo a LuxR por afinidad. Esta unión, regula la expresión de los genes relacionados con el QS (90).

1.7. Plasticidad genómica de *Acinetobacter baumannii*.

Desde la secuenciación del primer genoma de *A. baumannii* ATCC 17978 por Smith y col. (2007), el número creciente de secuencias de genomas completos o parciales depositados

y anotados en el GenBank ha posibilitado una gran cantidad de estudios genómicos de en *A. baumannii* (29). En la actualidad, hay 1136 genomas de *A. baumannii* anotados: 35 genomas completos, 72 genomas en *scaffolds* y 1029 genomas en *contigs* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/403>). Este alto número de secuencias disponibles ha permitido el desarrollo de un gran número de análisis genómicos comparativos centrados en resolver la estructura poblacional y relaciones filogenéticas de *A. baumannii*, así como en buscar pistas sobre el desarrollo y adquisición de mecanismos de resistencia y virulencia.

Así, mediante estudios genómicos comparativos se identificaron un grupo de genes específicos tanto de género como de especie. El pan-genoma se corresponde con el repertorio completo de genes existentes en un genoma bacteriano, el cual incluye la suma del núcleo del genoma y el genoma prescindible. El núcleo del genoma está formado por genes presentes en todas las cepas de una especie. El genoma prescindible, está formado por genes ausentes, en al menos, una cepa de una especie, incluyendo genes no esenciales para el crecimiento bacteriano, pero que les pueden conferir ventajas como la adaptación a nichos específicos, resistencia a estrés y patogenicidad (138).

El análisis del pan-genoma de *A. baumannii* mediante herramientas informáticas identificó 8.818 CDSs (*Coding DNA Sequence*). Un conjunto de 1.455 CDSs pertenecían al núcleo del genoma y los restantes 7.363 al genoma prescindible. El 25 % de los CDSs englobados dentro del genoma prescindible fueron únicos para cada especie (138). Este alto porcentaje de genes únicos de cada especie refleja la facilidad de *A. baumannii* para adquirir material genético exógeno y expandir así su genoma prescindible, lo cual destaca la importancia de los eventos de adquisición y pérdida de genes en la evolución y adaptación de este patógeno humano.

El núcleo del genoma está compuesto por aproximadamente 2.200 CDSs. La mayoría de los CDSs están relacionados con procesos metabólicos y funciones celulares (más del 65 %), mientras que una significativa fracción (sobre el 22 %) codifica proteínas hipotéticas cuya función no se puede conocer todavía. Otras proteínas englobadas dentro del núcleo del genoma están implicadas en adhesión y movilidad, *quorum sensing*, metabolismo del hierro y resistencia a drogas (aproximadamente un 8 % del núcleo del genoma).

2. OBJETIVOS

2. Objetivos

A. baumannii ha emergido en los últimos años como un importante patógeno nosocomial. La causa de su éxito se debe a su elevada capacidad para persistir en el ambiente hospitalario y a su alta tasa de multirresistencia. En el presente trabajo nos planteamos el estudio de los clones de *A. baumannii* aislados durante un importante brote hospitalario ocurrido en Madrid durante los años 2006-2008 con el fin de dilucidar los mecanismos moleculares implicados en el éxito de este patógeno.

Los objetivos de los cuatro capítulos que conforman la presente tesis doctoral se detallan a continuación:

2.1. Capítulo 1.

Objetivo 1. Analizar las bases moleculares de la resistencia a antibióticos de los clones de *A. baumannii* aislados durante el brote nosocomial ocurrido en el Hospital 12 de Octubre, Madrid, durante los años 2006-2008.

Objetivo 2. Estudiar la epidemiología clínica y molecular de los clones de *A. baumannii* aislados durante dicho brote.

2.2. Capítulo 2.

Objetivo 3. Estudiar el mecanismo de diseminación de la β -lactamasa OXA-24 entre las distintas cepas de *Acinetobacter* del brote.

Objetivo 4. Describir el mecanismo de resistencia de carbapenemes en una cepa de *Acinetobacter calcoaceticus*.

2.3. Capítulo 3.

Objetivo 5. Secuenciar el genoma completo de la cepa de *A. baumannii* AbH120-A2, clon mayoritario aislado durante el brote.

Objetivo 6. Analizar la secuencia completa del genoma de la cepa de *A. baumannii* AbH120-A2 para describir su estructura y anotación.

2.4. Capítulo 4.

Objetivo 7. Estudio fenotípico de la cepa de *A. baumannii* AbH12O-A2.

Objetivo 8. Estudiar la implicación del sistema de dos componentes AbFhaB/AbFhaC en la virulencia de la cepa de *A. baumannii* AbH12O-A2.

3. CAPÍTULOS

3.1. Capítulo I. Descripción de un brote nosocomial causado por una cepa de *Acinetobacter baumannii* portadora de una carbapenemasa tipo OXA-24 en España.

Las infecciones causadas por *A. baumannii* suponen un importante problema de salud pública. En los últimos años, han sido descritos múltiples brotes hospitalarios en diferentes hospitales de todo el mundo y el número de infecciones nosocomiales se ha incrementado sustancialmente. Estas infecciones son difíciles de tratar debido a la aparición de fenotipos multirresistentes a todos los antibióticos. En febrero de 2006, un paciente colonizado por una cepa de *A. baumannii* multirresistente ingresó en la UCI del hospital 12 de Octubre de Madrid. Esta cepa se diseminó rápidamente por la UCI y otras estancias hospitalarias, persistiendo durante más de 30 meses y causando un importante brote hospitalario que dejó a 377 pacientes infectados o colonizados, donde 65 casos fueron bacteriemias. La intensificación de las medidas de control de la infección, incluyendo la completa remodelación de la UCI médico-quirúrgica, no fue suficiente para el control del brote.

Este capítulo I se centra en el estudio epidemiológico molecular de *A. baumannii* durante este brote nosocomial. Para ello, se realizó un estudio retrospectivo longitudinal de todos los casos de infección por *A. baumannii* entre enero de 2006 y mayo de 2008 y un estudio retrospectivo de cohorte de los pacientes con bacteriemias producidas por *A. baumannii* entre enero de 2002 y mayo de 2008. Además, se realizó un estudio de los mecanismos moleculares implicados en la virulencia de las cepas de *A. baumannii* aisladas durante este brote.

Basándonos en los patrones de sensibilidad antibiótica de los diferentes aislados, se definieron tres perfiles diferentes: antibiotipo 1, aislados multirresistentes (resistentes a 5 tipos de antimicrobianos diferentes), antibiotipo 2, resistentes a carbapenemes pero no multirresistentes y antibiotipo 3, sensibles a los carbapenemes. Se definió colonización como el aislamiento de más de una muestra de *A. baumannii* sin síntomas de infección. Así, durante el período de estudio, entre Enero de 2006 y Mayo de 2008, 377 pacientes fueron colonizados/infectados por *A. baumannii*. Los datos obtenidos del estudio retrospectivo longitudinal fueron que la edad media de los pacientes era de 57 años siendo hombres en el 63,4 % de los casos. Los pacientes se encontraban hospitalizados mayoritariamente en UCIs

(184- 48,8 %), áreas quirúrgicas (100- 26,5 %), áreas médicas (85- 22,5 %) y áreas pediátricas (8- 2,1 %). Del número total de aislados considerados, 290 (77 %) pertenecían al antibiotipo 1, 34 aislados (9 %) pertenecían al antibiotipo 2 y 53 aislados (14 %) pertenecían al antibiotipo 3.

La relación clonal entre los diferentes aislados se estudió mediante la técnica de electroforesis de campo pulsado (PFGE). Un total de 21 pulsotipos diferentes fueron identificados, de los cuales, el 73 % pertenecían al mismo pulsotipo, correspondiente a la cepa AbH120-A2. De estas muestras pertenecientes al clon mayoritario del brote AbH120-A2, 165 pacientes fueron infectados (57 %) y 125 (43 %) fueron colonizados.

Con el fin de establecer una relación clonal de estas cepas con otras anteriormente descritas, se realizó la técnica de MLST a tres muestras pertenecientes al clon AbH120-A2. Los tres aislados mostraban el mismo perfil alélico: *gltA* (1), *gyrB* (18), *gdhB* (18), *recA* (10), *cpn60* (14), *gpi* (29) y *rpoD* (18), identificándose como una nueva secuencia ST (ST 56).

El clon AbH120-A2 mayoritario del brote mostraba un amplio patrón de multirresistencia antibiótica, siendo únicamente sensible a antibióticos tales como la colistina y la tigeciclina. El perfil de sensibilidad antibiótica de esta cepa clínica se muestra en la Tabla 1 del Anexo I. Numerosas muestras pertenecientes a este clon fueron aisladas durante todo el período de estudio, obteniéndose el pico máximo de aislados en Mayo de 2007. Tras la remodelación de la UCI en Julio de 2007, se produjo un descenso del número de nuevos pacientes (< 3 pacientes/mes).

El estudio retrospectivo de cohorte se realizó con el fin de conocer los factores de riesgo asociados a una bacteriemia causada por el clon AbH120-A2. Entre Enero 2002 y Mayo de 2008 fueron identificados 94 aislados de *A. baumannii* procedentes de bacteriemias. Los patrones de campo pulsado obtenidos con estas cepas se muestran en el Figura 1, Anexo I. En este periodo de tiempo la incidencia anual de bacteriemias producidas por *A. baumannii* se incrementó de 0,03 episodios por 100.000 camas/día en 2002 a 1,1 episodios por 100.000 camas/día en 2007, coincidiendo con el pico máximo del brote. La comparación de bacteriemias producidas por *A. baumannii* AbH120-A2 y las producidas por otros clones de *A. baumannii* reveló que los factores clínicos asociados a bacteriemias causadas por *A. baumannii* AbH120-A2 fueron la hospitalización en la UCI [Odds Ratio (OR) 3,48, 95 % intervalo de confianza (IC) 1,23 – 9,54], la exposición a más de tres drogas antimicrobianas (OR 3,13, 95 % IC 1,12 – 8,76) y la neumonía asociada a ventilación mecánica (OR 8,35, 95 % IC 1,12 – 8,76).

Mediante técnicas de PCR utilizando oligonucleótidos específicos de β -lactamasas de tipo carbapenemasa, se detectó el gen *bla*_{OXA-24} en el clon AbH12O-A2, localizado en el plásmido pMMA2 (código GenBank NC_013277.1). También se estudiaron cuatro representantes de otros pulsotipos, AbH12O-D, AbH12O-CU1 (Acal H12O-07), AbH12O-CU2, y AbH12O-CU3 que portaban *bla*_{OXA-24} en distintos plásmidos (códigos GenBank NC_019280.1, NC_013056.1, NC_013506.1 y NC_019199.1, respectivamente). Gracias a la secuenciación completa de los plásmidos, se pudo comprobar que, en todos los casos, el gen *bla*_{OXA-24} se encontraba flanqueado por sitios de recombinación XerC/XerD.

Un estudio detallado de las ORFs presentes en el plásmido pMMA2, reveló la presencia de dos posibles genes relacionados con la virulencia, que se encontraron también en el plásmido pMMCU3 de la cepa AbH12O-CU3. Se trataba de un gen que codifica una *septicolisina-like*, toxina formadora de poros, y un gen que codifica una proteína de membrana externa dependiente de TonB, relacionada con el transporte de hierro. Además, en el plásmido pMMA2 se encontró una secuencia de inserción de la familia IS4 localizado entre esos dos genes antes mencionados. Estudios de expresión mediante técnicas de qRT-PCR revelaron que estos dos genes estaban más expresados en el clon AbH12O-A2 que en el clon AbH12O-CU3. Concretamente, el gen de la septicolisina se expresaba más de dos veces y el gen de TonB se expresaba casi dos veces más en la cepa AbH12O-A2 que en las otras cepas aisladas del brote. Estos cambios de expresión se debieron, en el caso de la septicolisina, a la inserción de la secuencia IS4, la cual aportaba una nueva región promotora más potente, y, en el caso de proteína de membrana externa dependiente de TonB, al cambio de dos nucleótidos en la región promotora del gen.

En este capítulo I se describe el brote nosocomial y se explica cómo ciertas ventajas moleculares del clon AbH12O-A2 le permitieron instaurarse como clon mayoritario desplazando al resto de los clones del brote.

La correspondiente publicación se adjunta a continuación:

DISPATCHES

Multidrug-Resistant *Acinetobacter* *baumannii* Harboring OXA-24 Carbapenemase, Spain

Joshi Acosta,¹ María Merino,¹ Esther Viedma,
Margarita Poza, Francisca Sanz,
Joaquín R. Otero, Fernando Chaves,
and Germán Bou

In February 2006, a patient colonized with a multidrug-resistant sequence type 56 *Acinetobacter baumannii* strain was admitted to a hospital in Madrid, Spain. This strain spread rapidly and caused a large outbreak in the hospital. Clinicians should be alert for this strain because its spread would have serious health consequences.

The increasing resistance of *Acinetobacter baumannii* to antimicrobial drugs, including carbapenems (1–3), and resistance to desiccation and disinfectants (4) contribute to its persistence in hospital environments and propensity to cause outbreaks (5,6). In February 2006, a patient colonized with a multidrug-resistant *A. baumannii* strain was admitted to the medical–surgical intensive care unit (ICU) of a hospital in Madrid, Spain. This strain then spread rapidly, persisted for ≥ 30 months, and caused a large outbreak in the hospital. We report details of this outbreak.

The Study

We conducted a retrospective longitudinal study at 12 de Octubre University Hospital, Madrid, Spain, of patients colonized/infected with *A. baumannii* during January 2006–May 2008. We also conducted a cohort study of patients with *A. baumannii* bacteremia during January 2002–May 2008.

MICs of drugs were confirmed by using Etest strips (AB Biodisk, Solna, Sweden) according to the manufacturer's criteria. Multidrug-resistant (MDR) phenotypes were defined as resistance to 5 classes of drugs: antipseudomonal cephalosporins (ceftazidime, cefepime), carbapenems (imipenem, meropenem), piperacillin/tazobactam, fluoro-

Author affiliations: Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain (J. Acosta, E. Viedma, F. Sanz, J.R. Otero, F. Chaves); and Complejo Hospitalario Universitario La Coruña, La Coruña, Spain (M. Merino, M. Poza, G. Bou)

DOI: 10.3201/eid1706.091866

quinolones, and aminoglycosides (gentamicin, tobramycin, amikacin). Isolates were classified on the basis of antimicrobial susceptibility patterns: antibiotype 1, MDR isolates; antibiotype 2, isolates resistant to carbapenems but not MDR; and antibiotype 3, isolates susceptible to carbapenems. Colonization was defined as isolation of *A. baumannii* from ≥ 1 clinical specimen in the absence of clinical symptoms consistent with infection. Bacteremia was determined by application of criteria proposed by the Centers for Disease Control and Prevention (Atlanta, GA, USA) (7).

Clonal relatedness between clinical isolates was determined by using pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and the CHEF DRIII system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) according to reported techniques (8). Migration of DNA fragments was normalized, and computer-assisted analysis of PFGE patterns was conducted by using Bionumerics software (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). Multilocus sequence typing (MLST) was performed according to published protocols (9). Isolates were assigned to a sequence type according to the allelic profiles database (<http://pubmlst.org/abaumannii/>). Univariate analysis was performed by using the *t* test for continuous variables and the χ^2 or Fisher exact tests for categorical variables. Adjusted odds ratios (ORs) were calculated by using logistic regression analysis. Data were analyzed by using SPSS software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). A *p* value < 0.05 was considered significant.

During January 2006–May 2008, a total of 377 patients were colonized/infected with *A. baumannii*. Mean age of the patients was 57 years and 63.4% were men. Patients were hospitalized mostly in ICUs (184, 48.8%), and in surgical (100, 26.5%), medical (85, 22.5%), and pediatric (8, 2.1%) wards. A total of 76.9% (290/377) of the isolates were antibiotype 1, 9.0% (34/377) were antibiotype 2, and 14.1% (53/377) were antibiotype 3. Temporal distribution of cases is shown in Figure 1, panel A. Bacterial isolates of antibiotype 1 were assigned to the major clonal type (clone AbH12O-A2) by PFGE. Of 290 patients with *A. baumannii* antibiotype 1 isolates (clone AbH12O-A2), 165 patients were infected (57%) and 125 (43%) were colonized.

MLST analysis of 3 isolates belonging to clone AbH12O-A2 was performed to determine the relationship between these isolates and other described strains. The 3 isolates showed the same allelic profile of 7 housekeeping genes (allele no. in brackets; *gltA* [1], *gyrB* [18], *gdhB* [18], *recA* [10], *cpn60* [14], *gpi* [29], and *rpoD* [18]) and were identified as sequence type 56 according to the MLST database (<http://pubmlst.org/abaumannii/>).

A. baumannii clone AbH12O-A2, which showed a broad antimicrobial drug-resistance profile, resistance to carbapenems, and susceptibility only to tigecycline and colistin, was present throughout the entire 30-month study

¹These authors contributed equally to this article.

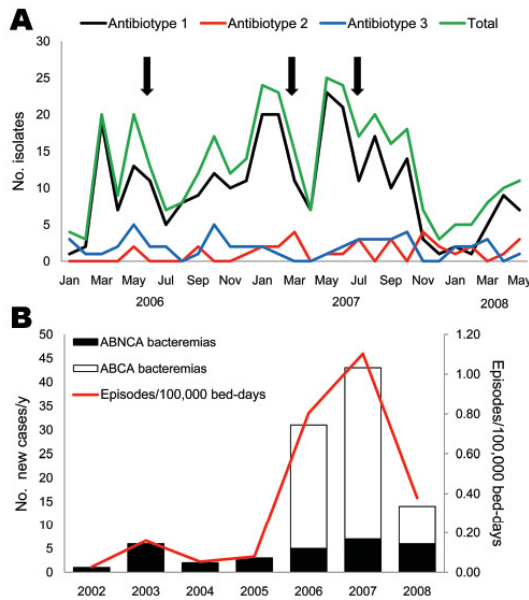


Figure 1. Temporal distribution of patients with *Acinetobacter baumannii* infections, Spain. A) Patients colonized/infected with *A. baumannii* classified by antibiotype. Arrows indicate times of intensification of infection control measures. The medical-surgical intensive care unit at Octubre University Hospital, Madrid, Spain, was refurbished in July 2007. B) Annual incidence of *A. baumannii* bacteremia. ABCA, *A. baumannii* clone A or AbH120-A2; ABNCA: *A. baumannii* nonclone A.

and peaked several times until the medical-surgical ICU was refurbished in July 2007. The number of new case-patients with clone AbH120-A2 then decreased; ≤ 3 cases/month were observed during October 2007–February 2008 (Figure 1, panel A).

Annual incidence of *A. baumannii* bacteremia increased from 0.03 episodes/100,000 bed days in 2002 to 1.1/100,000 bed days in 2007 (Figure 1, panel B), which coincided with the outbreak peak caused by clone AbH120-A2. Clinical features of patients with *A. baumannii* bacteremia are shown in Table 1. Multivariate analysis of bacteremia caused by clone AbH120-A2 and nonclone AbH120-A2 showed that variables independently associated with AbH120-A2 bacteremia were hospitalization in ICUs (OR 3.48, 95% confidence interval [CI] 1.23–9.54), exposure to ≥ 3 antimicrobial drugs (OR 3.13, 95% CI 1.12–8.76), and ventilator-associated pneumonia as the source of bacteremia (OR 8.35, 95% CI 1.12–8.76).

Plasmid pMMA2 (GenBank accession no. GQ37752), which was isolated from the clone causing the outbreak (AbH120-A2), harbored a *bla*_{OXA-24} gene (10) coding for carbapenemase OXA-24 (also called OXA-40) as

described (11). Four additional clones were detected during the outbreak (AbH120-D, AbH120-CU1, AbH120-CU2, and AbH120-CU3), which harbored plasmids pMMD, pMMC1, pMMC2, and pMMC3, respectively (GenBank accession nos. GQ904226, GQ342610, GQ476987, and GQ904227). Carbapenem resistance in all clones was linked to a plasmid harboring the *bla*_{OXA-24} gene flanked by XerC/XerD-like recombination sites (11). Comparative analysis among plasmid sequences showed different patterns and coding regions. All plasmids, including pMMA2, harbored the *bla*_{OXA-24} gene as part of a DNA module flanked by XerC/XerD-like sites, which suggested that these sites are involved in mobilization of DNA containing the *bla*_{OXA-24} gene by site-specific recombination (11).

Two genes with a putative role in virulence were detected in plasmids from clones AbH120-A2 and AbH120-CU3 upstream of *bla*_{OXA-24}: a septicolysin-like gene coding for a pore-forming toxin (12), and a TonB-dependent receptor gene coding for an outer membrane protein involved in iron uptake and virulence (13–15). Insertion sequence 4, which provided an additional promoter sequence, was detected upstream from the septicolysin gene in plasmid pMMA2;



Figure 2. Nucleotide sequence of the region between the septicolysin and TonB dependent receptor genes of *Acinetobacter baumannii* in plasmids pMMA2 and pMMC3 from clone AbH120-A2 (upper panel) and AbH120-CU3 (lower panel), respectively. Integrated insertion sequence 4 (IS4) (red letters) provided a new promoter sequence for septicolysin in plasmid pMMA2 from clone AbH120-A2. Upper case letters indicate amino acids. IRL, inverted repeated left sequence; IRR, inverted repeated right sequence from IS4; Stop, stop (termination) codon.

DISPATCHES

Table 1. Clinical characteristic of patients with *Acinetobacter baumannii* bacteremia, Spain*

Characteristic	Clone ABCA, n = 65	Clone ABNCA, n = 29	p value	OR (95% CI)
Age, y	57.5 ± 14.2	58.7 ± 19.6	0.730	NA
Male sex	50 (76.9)	21 (72.4)	0.639	1.27 (0.47–3.45)
Concurrent conditions				
Immunosuppression	12 (18.5)	6 (20.7)	0.800	0.87 (0.29–2.60)
Solid tumor	16 (24.6)	6 (20.7)	0.678	1.25 (0.43–3.62)
Hematologic malignancy	1 (1.5)	1 (3.4)	0.553	0.44 (0.03–7.25)
Diabetes mellitus	9 (13.8)	9 (31.0)	0.050	0.36 (0.12–1.03)
Liver cirrhosis	11 (16.9)	3 (10.3)	0.408	1.76 (0.45–6.88)
Heart failure	4 (6.2)	3 (10.3)	0.475	0.57 (0.12–2.72)
Chronic obstructive pulmonary disease	7 (10.8)	3 (10.3)	0.951	1.05 (0.25–4.37)
Liver transplant	15 (23.1)	7 (24.1)	0.911	0.94 (0.34–2.64)
Duration of hospitalization before <i>A. baumannii</i> bacteremia, d	34.8 ± 36.1	23.9 ± 27.5	0.150	NA
Hospital location				
Intensive care unit	41 (63.1)	9 (31.0)	0.004	3.80 (1.50–9.66)
Medical ward	6 (9.2)	12 (41.4)	0.001	0.14 (0.05–0.44)
Surgical ward	18 (27.7)	8 (27.6)	0.992	1.00 (0.38–2.68)
Source of bacteremia				
Catheter-related infection	25 (38.5)	9 (31.0)	0.489	1.39 (0.54–3.52)
Pneumonia associated with mechanical ventilation	18 (27.7)	1 (3.4)	0.006	10.72 (1.36–84.8)
None (primary bacteremia)	12 (18.5)	14 (48.3)	0.003	0.24 (0.09–0.63)
Intraabdominal infection	7 (10.8)	2 (6.9)	0.716	1.62 (0.32–8.37)
Urinary tract infection	3 (4.6)	2 (6.9)	0.642	0.65 (0.10–4.13)
Other	0	1 (3.4)	0.309	3.32 (2.43–4.52)
Carbapenem resistance	65 (100.0)	7 (24.1)	0.001	0.09 (0.50–0.20)
Prior colonization with <i>A. baumannii</i>	43/62 (69.4)	1/17 (5.9)	0.001	36.21(4.47–293.1)
Antimicrobial drugs used				
Cephalosporin	7/62 (11.3)	3/29 (10.3)	0.893	1.10 (0.26–4.61)
Piperacillin/tazobactam	21/62 (33.9)	4/29 (13.8)	0.046	3.20 (0.98–10.41)
Fluoroquinolone	24/62 (38.7)	9/29 (31.0)	0.478	1.40 (0.54–3.59)
Glycopeptide	44/62 (71.0)	12/29 (41.4)	0.007	3.46 (1.38–8.69)
Aminoglycoside	17/62 (27.4)	8/29 (27.6)	0.987	0.99 (0.37–2.66)
Carbapenem	41/62 (66.1)	11/29 (37.9)	0.011	3.20 (1.28–7.99)
≥3 drugs	36/62 (58.1)	8/29 (27.6)	0.007	3.63 (1.40–9.47)
Invasive procedure or device				
Central venous catheter†	51/64 (79.7)	15/29 (51.7)	0.006	3.66 (1.42–9.46)
Surgical procedure‡	33/64 (51.6)	11/29 (37.9)	0.223	1.74 (0.71–4.27)
Mechanical ventilation†	49/64 (76.6)	14/29 (48.3)	0.007	3.50 (1.38–8.87)
Duration of hospitalization after <i>A. baumannii</i> bacteremia, d	46.6 ± 72.9	20.5 ± 21.2	0.050	NA
Died during hospitalization	35 (53.8)	9 (31.0)	0.041	2.59 (1.03–6.54)

*Values are mean ± SD or no. (%) except as indicated. Clone ABCA, *A. baumannii* clone A (AbH12O-A2); ABNCA, *A. baumannii* nonclone A; OR, odds ratio; CI, confidence interval; NA, not applicable.
 †Week before bacteremia.
 ‡Month before bacteremia.

this sequence was absent in plasmid pMMCU3 (Figure 2). Two nucleotide changes detected in promoter regions provided an additional promoter region for the TonB-dependent receptor gene in plasmid pMMA2.

Real-time PCR (Table 2) was performed to analyze expression of septicolysin and TonB-dependent receptor genes in clones AbH12O-A2 and AbH12O-CU3. Expression of septicolysin in clone AbH12O-A2 was 2.1× times higher than that of clone AbH12O-CU3. Conversely, the TonB-dependent receptor was also overexpressed in clone AbH12O-A2 (1.8× higher than in clone AbH12O-CU3).

Conclusions

Outbreaks of MDR *A. baumannii* have been demonstrated in many studies (1,2,5). We report a large outbreak during 2006–2008 that persisted for ≥30 months. The AbH12O-A2 strain was pathogenic and caused 65 cases of bacteremia.

Clone AbH12O-A2 had unique characteristics. First, it was an MDR (including carbapenems) clone (ST56), susceptible only to tigecycline and colistin. Second, it harbored a carbapenemase *bla*_{OXA-24} gene, flanked by XerC/XerD binding sites located on a plasmid, which probably spread to other *Acinetobacter* clones by a Xer

Table 2. Oligonucleotides used in real-time reverse transcription PCRs for *Acinetobacter baumannii*, Spain*

Primer	Gene	Sequence, 5' → 3'
TonB-Forw	TonB-dependent receptor	GGACTGGTGATAAAGCACTAT
TonB-Rev	TonB-dependent receptor	GCCGCATAGAGTTATCACATC
Septicolysin-Forw	Septicolysin	CACCATCTTGTACCAATACATTT
Septicolysin-Rev	Septicolysin	GAAATTAGCAGAAGCTCTCTTAC
rpoB-Forw	RNA polymerase subunit B	CAGCCGCGAYCAGGTTGACTACA
rpoB-Rev	RNA polymerase subunit B	GACGCACCGCAGGATACCACCTG
gyrB-Forw	DNA gyrase subunit B	AAGTGAGGTAAAACCGCGGTA
gyrB-Rev	DNA gyrase subunit B	AATCTTGCCTGCAATTGATTTT

*Forw, forward; rev, reverse.

recombination system (11). Third, this clone overexpressed 2 putative virulence factors, septicolysin and TonB-dependent receptor.

The septicolysin gene showed 2× overexpression caused by insertion of IS4, which provided an additional promoter. Although the exact role of septicolysin is unknown, it has been designated a cholesterol-dependent cytotoxin, which has been reported to be produced by pathogenic bacteria such as *Clostridium perfringens*, *Bacillus anthracis*, and *Streptococcus pneumoniae* to aid invasion of tissues or cells (12).

The protein produced by the TonB-dependent receptor gene has been associated with virulence and iron uptake in *A. baumannii* (13) and may be involved in survival of bacteria in the lungs and blood. This characteristic may explain the large rate of bacteremia caused by clone AbH120-A2. Thus, clinicians should be alert for the MDR ST56 *A. baumannii* clone because its spread would have serious health consequences.

This study was supported by the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (grants RD06/0008/0011, RD06/0008/0025, PI081613, and PS09/00687) for the Instituto de Salud Carlos III.

Dr Acosta is a clinical microbiologist at Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain. Her primary research interests are epidemiology of nosocomial infections and mechanisms of antimicrobial drug resistance.

References

- del Mar Tomas M, Cartelle M, Pertega S, Beceiro A, Linares P, Canelo D, et al. Hospital outbreak caused by a carbapenem-resistant strain of *Acinetobacter baumannii*: patient prognosis and risk-factors for colonisation and infection. *Clin Microbiol Infect.* 2005;11:540–6. doi:10.1111/j.1469-0691.2005.01184.x
- Corbella X, Montero A, Pujol M, Dominguez MA, Ayats J, Argerich MJ, et al. Emergence and rapid spread of carbapenem resistance during a large and sustained hospital outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol.* 2000;38:4086–95.
- Lee NY, Lee HC, Ko NY, Chang CM, Shih HI, Wu CJ, et al. Clinical and economic impact of multidrug resistance in nosocomial *Acinetobacter baumannii* bacteremia. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2007;28:713–9. doi:10.1086/517954

- Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21:538–82. doi:10.1128/CMR.00058-07
- Villegas MV, Hartstein AI. *Acinetobacter* outbreaks, 1977–2000. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2003;24:284–95. doi:10.1086/502205
- Naas T, Coignard B, Carbonne A, Blanckaert K, Bajeot O, Bernet C, et al. VEB-1 extended-spectrum β-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii*, France. *Emerg Infect Dis.* 2006;12:1214–22.
- Horan TC, Andrus M, Dudeck MA. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *Am J Infect Control.* 2008;36:309–32. doi:10.1016/j.ajic.2008.03.002
- Seifert H, Dolzani L, Bressan R, van der Reijden T, van Strijen B, Stefanik D, et al. Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol.* 2005;43:4328–35. doi:10.1128/JCM.43.9.4328-4335.2005
- Bartual SG, Seifert H, Hippler C, Luzon MA, Wisplinghoff H, Rodriguez-Valera F. Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol.* 2005;43:4382–90. doi:10.1128/JCM.43.9.4382-4390.2005
- Bou G, Oliver A, Martinez-Beltran J. OXA-24, a novel class D beta-lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44:1556–61. doi:10.1128/AAC.44.6.1556-1561.2000
- Merino M, Acosta J, Poza M, Sanz F, Beceiro A, Chaves F, et al. OXA-24 carbapenemase gene flanked by XerC/XerD-like recombination sites in different plasmids from different *Acinetobacter* species isolated during a nosocomial outbreak. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54:2724–7. doi:10.1128/AAC.01674-09
- Rosado CJ, Kondos S, Bull TE, Kuiper MJ, Law RH, Buckle AM, et al. The MACPF/CDC family of pore-forming toxins. *Cell Microbiol.* 2008;10:1765–74. doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01191.x
- Dorsey CW, Tolmasek ME, Crosa JH, Actis LA. Genetic organization of an *Acinetobacter baumannii* chromosomal region harbouring genes related to siderophore biosynthesis and transport. *Microbiology.* 2003;149:1227–38. doi:10.1099/mic.0.26204-0
- Torres AG, Redford P, Welch RA, Payne SM. TonB-dependent systems of uropathogenic *Escherichia coli*: aerobactin and heme transport and TonB are required for virulence in the mouse. *Infect Immun.* 2001;69:6179–85. doi:10.1128/IAI.69.10.6179-6185.2001
- Reeves SA, Torres AG, Payne SM. TonB is required for intracellular growth and virulence of *Shigella dysenteriae*. *Infect Immun.* 2000;68:6329–36. doi:10.1128/IAI.68.11.6329-6336.2000

Address for correspondence: Germán Bou, Servicio de Microbiología, Complejo Hospitalario Universitario La Coruña, Xubias de Arriba s/n, La Coruña, 15006, Spain; email: german.bou.arevalo@sergas.es

Capítulo II. El gen de la β -lactamasa OXA-24 se encuentra flanqueado por los sitios de recombinación XerC/XerD-like en los diferentes plásmidos de todas las cepas de *Acinetobacter* spp aisladas durante el brote.

Desde que en 1986 se describió por primera vez el género *Acinetobacter* gracias a técnicas de hibridación Southern-Blot, *Acinetobacter calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. pittii* y *A. nosocomialis* componen lo que se denomina complejo ACB (*A. calcoaceticus*-*A. baumannii*) Desde el punto de vista clínico, este complejo pertenece al grupo molecular de mayor importancia clínica dentro del género *Acinetobacter*, dado que la mayoría de las infecciones humanas son producidas por estas especies, exceptuando *A. calcoaceticus*. Entre los mecanismos de resistencia asociados a estas especies, el más importante consiste en la producción de β -lactamasas y, en concreto, de las β -lactamasas de clase D. Se han publicado múltiples trabajos en los que se describen cepas de *A. baumannii*, *A. pittii* y *A. nosocomialis* portadoras de β -lactamasas de clase D.

A. calcoaceticus tradicionalmente ha sido considerada una especie ambiental no relacionada con infecciones clínicas severas. Hasta la fecha no se había descrito ninguna β -lactamasa clase D en *A. calcoaceticus* a excepción de una metalo- β -lactamasa IMP-4 localizada en un integrón.

Durante el brote hospitalario producido por cepas de *A. baumannii* multirresistentes en el Hospital 12 de Octubre de Madrid durante los años 2006 y 2008, se aisló una cepa de *A. calcoaceticus* resistente a los carbapenemes (Acal H12O-07). Se realizaron estudios moleculares con el fin de describir el mecanismo implicado en la resistencia a carbapenemes y se descubrió que esta cepa contenía una β -lactamasa OXA-24. La β -lactamasa OXA-24 de *A. calcoaceticus* se encontraba albergada en el plásmido pMMCU1.

Se realizó la secuenciación completa de los plásmidos extraídos a partir de todas las cepas del brote, nombrados como pMMA2, pMMD, pMMCU1, pMMCU2 y pMMCU3. Las secuencias correspondientes se depositaron en el Genbank con los códigos de acceso NC_013277.1, NC_019280.1, NC_013056.1, NC_013506.1 y NC_019199.1, respectivamente. Se observó que el gen *bla*_{OXA-24}, presente en todos los plásmidos, estaba flanqueado por unas

secuencias repetidas invertidas XerC/XerD. La representación de estos plásmidos se encuentra en el Anexo II.

En el presente capítulo se describe la presencia de estos sitios de recombinación XerC/XerD y cómo su existencia podría estar relacionada con la movilización y diseminación de esta β -lactamasa entre las distintas cepas de *A. baumannii* e, incluso, entre diferentes especies del género (*baumannii-calcoaceticus*). Además, se describe por primera vez la presencia de una carbapenemasa OXA-24 en una cepa de *A. calcoaceticus*.

La correspondiente publicación se adjunta a continuación:

OXA-24 Carbapenemase Gene Flanked by XerC/XerD-Like Recombination Sites in Different Plasmids from Different *Acinetobacter* Species Isolated during a Nosocomial Outbreak[∇]

María Merino,¹† Joshi Acosta,²† Margarita Poza,¹ Francisca Sanz,² Alejandro Beceiro,¹ Fernando Chaves,² and Germán Bou^{1*}

Laboratorio de Microbiología, Complejo Hospitalario Universitario A Coruña-INIBIC, Xubias de Arriba s/n, 15006 La Coruña, Spain,¹ and Servicio de Microbiología, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain²

Received 26 November 2009/Returned for modification 7 February 2010/Accepted 3 April 2010

A clinical strain of *Acinetobacter calcoaceticus* resistant to carbapenems was isolated from a blood culture sample from an inpatient in a hospital in Madrid (Spain) during a large outbreak of infection (affecting more than 300 inpatients), caused by a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clone. The carbapenem resistance in both the *A. calcoaceticus* and *A. baumannii* clones was due to a *bla*_{OXA-24} gene harbored in different plasmids. The plasmids were fully sequenced, revealing the presence of site-specific recombination binding sites putatively involved in mobilization of the *bla*_{OXA-24} gene. Comparison of plasmids contained in the two strains revealed possible horizontal transmission of resistance genes between the *Acinetobacter* species.

Since 1986, members of the genus *Acinetobacter* have been identified by Southern hybridization. Genospecies 1 (*Acinetobacter calcoaceticus*), 2 (*Acinetobacter baumannii*), 3, and 13TU are genetically closely related and are commonly known as the *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex. With the exception of genospecies 1, the other members of this complex have been reported to be involved in nosocomial infections and are known to have the ability to spread within hospitals (1, 12). *Acinetobacter calcoaceticus* has traditionally been considered an environmental species and has never been associated with serious clinical infections.

Among β -lactamases, the most prevalent carbapenemases in *Acinetobacter* spp. are the class D β -lactamases, which are divided into 4 different groups: OXA-23, OXA-24, and OXA-58 with all their variants (17) and the OXA-51 family, which has been described as being intrinsic to *A. baumannii* (6). Although these β -lactamases have mainly been isolated from *A. baumannii*, recent studies have demonstrated the presence of OXA-58 in *Acinetobacter* genomic species 3, as well as in *Acinetobacter* phenon 6/ct13TU (10, 11) and in *Acinetobacter* genomospecies 13TU (8). None of these class D β -lactamases have been described in *A. calcoaceticus* (7).

During an outbreak of infection caused by a multidrug-resistant (including carbapenems) *A. baumannii* clone (named AbH120-A2), which occurred in the 12 de Octubre Hospital (Madrid, Spain) and affected more than 300 patients, an *A. calcoaceticus* strain (named Acal H120-07) was isolated from blood cultures from a 58-year-old man. The patient was admitted to the hospital with a cranial encephalic trauma. After admission and during the course of his stay, the patient pre-

sented several nosocomial infections. The patient was empirically treated with different cycles of antibiotics, starting with ceftriaxone plus levofloxacin, then piperacillin-tazobactam, meropenem plus vancomycin, and finally linezolid plus imipenem. After 4 months of hospitalization and in light of persistent fever, two sets of blood cultures were drawn and yielded isolation of a Gram-negative bacillus. The microorganism was identified with the automated WIDER system as a member of the *A. baumannii*-*A. calcoaceticus* complex. The antibiotic susceptibility profile obtained by microdilution revealed the following MICs (μ g/ml): piperacillin-tazobactam, >64/4; ceftazidime, >16; ceftazidime, >16; imipenem, >8; meropenem, >8; tobramycin, \leq 2; amikacin, >16; gentamicin, \leq 2; ciprofloxacin, 1; trimethoprim-sulfamethoxazole, \leq 2/38. After clinical evaluation, the case was considered a primary bacteremia and the patient was administered a course of antimicrobial treatment with ciprofloxacin and gentamicin for 2 weeks, with a favorable clinical response.

The 16S rRNA of the isolate was also sequenced and yielded identification of an *A. calcoaceticus* strain. A putative β -lactamase enzyme with carbapenemase activity was detected by the Hodge test (9). A PCR amplification with primers designed from class D carbapenemase genes and metallo- β -lactamase genes (*bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, and *bla*_{SIM}) from *Acinetobacter* (18) yielded isolation of a *bla*_{OXA-24} gene. A plasmid, named pMMCU1, was isolated from the clinical *A. calcoaceticus* strain. This plasmid was used to transform an *A. baylyi* ADP1 isolate. Imipenem and meropenem MICs for the *A. baylyi* ADP1 strain increased from 0.094 and 0.25, respectively, to >32 μ g/ml in both cases, when the strain was transformed with plasmid pMMCU1. Moreover, a band corresponding to the *bla*_{OXA-24} gene was also obtained by PCR, with the plasmid isolated from the transformed *A. baylyi* ADP1 strain as template. The gene product revealed 100% identity with the previously described *bla*_{OXA-24} gene (2). The full plasmid was sequenced and was found to be 8,771

* Corresponding author. Mailing address: Laboratorio de Microbiología, Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, Xubias s/n, 3^a Planta Ed. Sur, 15006 La Coruña, Spain. Phone: 34-981 176087. Fax: 34-981 176097. E-mail: German.Bou.Arevalo@sergas.es.

† The two authors contributed equally to this work.

[∇] Published ahead of print on 12 April 2010.

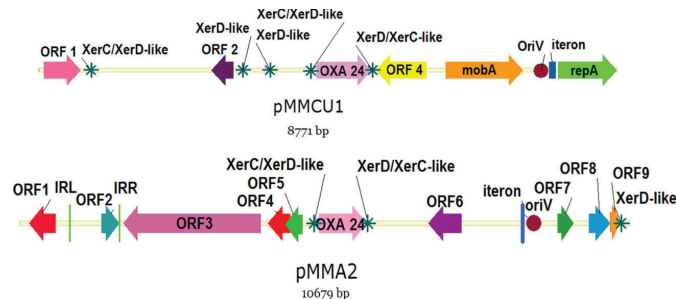


FIG. 1. (Top) Diagram of the 8,771-bp pMMC1 plasmid obtained from the *A. calcoaceticus* clinical strain (Acal H120-07). (Bottom) Diagram of the 10,679-bp pMMA2 plasmid obtained from the *A. baumannii* strain (AbH120-A2) that caused the large outbreak of infection. The asterisks indicate the Xer-like recombination sites.

bp in size (GenBank accession code GQ342610). Moreover, the *A. baumannii* clone that caused the large outbreak was found to carry the pMMA2 plasmid (GenBank accession code GQ377752), which was also isolated, analyzed, and found to be 10,679 bp in size.

Comparative analysis among the sequences of the two plasmids revealed different scaffolds and coding regions, as shown in Fig. 1 and Tables 1 and 2. The pMMC1 plasmid showed the highest homology with plasmid pABO2 (GenBank accession code AY228470) and carried the mobilization region derived from the previously described pMAC plasmid (GenBank accession code AY541809). The pMMA2 plasmid displayed the highest homology with the previously described p2ABAYE plasmid (GenBank accession code CU459138.1).

The *bla*_{OXA-24} gene was detected in both the pMMC1 and pMMA2 plasmids and was found to be flanked by 11-bp conserved inverted repeats separated by a 6-bp variable region (GenBank accession codes GQ342610 and GQ377752). The 5' sequence flanking the *bla*_{OXA-24} gene in the pMMC1 plasmid was ATTTTCGCATAACGCCCATATGTTAAAT, and the 3' sequence was AATTAACATAATACGCCTTATGCGAAAT. Similarly, in the case of the pMMA2 plasmid, the sequence located at the 5' position was ACTTTCGGATAACGCCCATATGTTAAAT, and that located at the 3' position was TTAA

CATAATACACCTTATACGAAATGC. The Xer-like binding site sequences described in the pMMC1 and pMMA2 plasmids showed 79.5, 76, 76, 91, 74, 81.5, and 90.5% and 76.5, 73, 73, 88.5, 80, 76.5, and 88.5% identity, respectively, with their counterparts found in plasmids pABVA01, p2ABAYE, pAB0057, pAB02, pAB2, pAV1, and pABIR, respectively, and in both cases they showed the highest identity, 100% and 88.5%, respectively, with the XerC/XerD-like binding sites located in the chromosomal region of the *bla*_{OXA-24} gene previously described in the RYC52763/97 strain (2, 5).

The *bla*_{OXA-24} gene was already observed as part of one of the discrete DNA modules flanked by XerC/XerD-like sites within *Acinetobacter* plasmids. These Xer-like binding sites have been suggested to be involved in the mobilization of discrete DNA modules within *Acinetobacter* plasmids and chromosomes by site-specific recombination mechanisms (5).

Moreover, other plasmids were also isolated from minor *A. baumannii* clones that appeared during the outbreak (GenBank accession codes GQ904226, GQ476987, and GQ904227). These plasmids also harbored the *bla*_{OXA-24} gene integrated in different locations flanked by XerC/XerD-like binding sites. These results show that during the outbreak there was no exchange of a common plasmid carrying the *bla*_{OXA-24} gene among the strains isolated. On the

TABLE 1. Description of the pMMC1 plasmid isolated from *A. calcoaceticus* (AcalH20-07)

Feature ^a	Positions	Properties and/or putative function	GenBank/EMBL accession no. of match	Plasmid or chromosomal homology (reference)
ORF 1	74–631	Hypothetical protein	AY228470	pAB02
XerC/XerD-like	782–809	Recombination sites	FM210331.1	pABVA01
ORF 2	2621–2941	Hypothetical protein	CU468230	ABSDF
XerD-like	3090–3100	Recombination sites	FM210331.1	pABVA01
XerD-like	3503–3513	Recombination sites	FM210331.1	pABVA01
XerC/XerD-like	4116–4143	Recombination sites	AJ239129	RYC52763/97 (2) ^a
<i>bla</i> _{OXA-24}	4217–5044	Carbapenem-hydrolyzing oxacillinase	AJ239129	RYC52763/97 (2) ^a
XerD/XerC-like	5055–5082	Recombination sites	AJ239129	RYC52763/97 (2) ^a
ORF 4	5113–5874	Hypothetical protein	AY541809	pMAC
MobA	6174–7343	Plasmid mobilization protein	AY541809	pMAC
OriV	7524–7724	Origin of DNA replication	AY228470	pAB02
Iteron	7741–7836	Imperfect 4-repeat iterons; control of DNA replication	AY228470	pAB02
RepA	7881–8768	repA_AB; DNA replication protein	AY228470	pAB02

^a Chromosomal DNA of strain RYC52763/97 (2).

^b ORF, open reading frame.

TABLE 2. Description of the pMMA2 plasmid isolated from the *A. baumannii* strain that caused a large outbreak of infection (AbH120-A2)^a

Feature	Positions	Properties and/or putative function	GenBank/EMBL accession no. of match(es)	Plasmid or chromosomal homology (reference)
ORF 1	141–602	Septicolyisin (endotoxin)	CU459138.1	p2ABAYE
IRL	855–872	IS4 inverted repeat left	YP_001957893.1	NA
ORF 2	1418–1719	Putative IS4 transposase family	YP_001957893.1	NA
IRR	1722–1739	IS4 inverted repeat right	YP_001957893.1	NA
ORF 3	1793–4204	Putative TonB-dependent receptor	CU459138.1	p2ABAYE
ORF 4	4332–4715	Putative cytoplasmic protein	CU459138.1	p2ABAYE
ORF 5	4633–4929	Putative inner membrane protein	CU459138.1	p2ABAYE
XerC/XerD-like	5128–5155	Recombination sites	AJ239129, AY228470, NC_010481	RYC52763/97 (2) ^b pABO2 pABIR
<i>bla</i> _{OXA-24}	5229–6056	Carbapenem-hydrolyzing oxacillinase	AJ239129	RYC52763/97 (2) ^b
XerC/XerD-like	6069–6096	Recombination sites	AJ239129, AY228470, NC_010481	RYC52763/97 (2) ^b pABO2 pABIR
ORF 6	7145–7714	DNA replication protein	ZP_04663577	AB900
Iteron	8791–8878	Imperfect 4-repeat iterons; control of DNA replication	CU459138.1	p2ABAYE
OriV	8896–9100	Replication origin	CU459138.1	p2ABAYE
ORF 7	9410–9682	Hypothetical protein	CU459138.1	p2ABAYE
ORF 8	9953–10324	Hypothetical protein	CU459138.1	p2ABAYE
ORF 9	10324–10497	Hypothetical protein	CU459138.1	p2ABAYE
XerD-like	10521–10531	Recombination sites	CU459138.1	p2ABAYE

^a Abbreviations: ORF, open reading frame; IRL, inverted repeat, left; IRR, inverted repeat, right; NA, not applicable.

^b Chromosomal DNA of strain RYC52763/97 (2).

contrary, the plasmid structures provide evidence supporting the hypothesis that different plasmids exchange the *bla*_{OXA-24} gene comprised within a very limited region between the two closest XerC/XerD-like binding sites.

DNA recombination through the Xer system in plasmids requires XerC and XerD (recombinases); XerC/XerD-like binding sites; accessory proteins, such as PepA, ArgR, and ArcA; and an accessory sequence of about 180 bp located near the core site (3, 4, 13, 15). Recombination occurs via formation of a heterotetrameric complex in which each recombinase catalyzes the exchange of one pair of DNA strands in a reaction that proceeds through the Holliday junction intermediate. The accessory proteins bind the accessory sequence and induce formation of a synaptic complex that is required for recombination (3). These recombination events are involved in site-specific integration and excision of lysogenic genomes, transposition of conjugative transposons, termination of chromosome replication, and plasmid stability (3, 14, 16).

Sequence analysis revealed that all the plasmids isolated from the outbreak carried the same *bla*_{OXA-24} mobilization cassette, which contained the following regions, from 5' to 3': a region of 142 bp followed by XerC/XerD-like binding sites, a region of 72 bp, and the *bla*_{OXA-24} gene finally followed by 10 bp and the downstream XerD/XerC-like binding sites (GenBank accession codes GQ342610, GQ377752, GQ904226, GQ476987, and GQ904227, respectively). We suggest that both of these regions, of 142 and 72 bp, may act as targets for the accessory proteins required for Xer recombination. Moreover, we found that XerC and XerD recombinases are encoded in the *A. baumannii* chromosome of strains AB0057, SDF, AYE, and ACICU (GenBank accession codes for XerC: YP_002320364.1, YP_001706416.1, YP_001712817.1, and YP_001847531.1, respectively; for XerD: ZP_02977538.1, YP_001708368, YP_001715285.1, and YP_001844923.1, respectively). PepA has been also found in the genomes of *A. baumannii* AB0057, SDF, and AYE (GenBank accession codes YP_002317727.1, YP_001708379.1, and YP_001715297.1, respectively).

These findings suggest that Xer recombination may be responsible for mobilization of the *bla*_{OXA-24} gene, and experiments are in progress to confirm this hypothesis. As the Xer-like binding sites are located in opposite directions, recombination through the Xer system should occur by gene inversion. Therefore, the most likely explanation would seem to be that putative Xer-mediated recombination events led to the dissemination of the *bla*_{OXA-24} gene among different plasmids and that acquisition of the resistance gene by *A. calcoaceticus* was mediated by the transfer of one of these plasmids. Note that *A. calcoaceticus* is usually regarded as an environmental species and this is the first description of a plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing oxacillinase, OXA-24, isolated from an *A. calcoaceticus* strain causing bacteremia.

Dissemination of resistance genes via Xer recombination in plasmids has previously been suggested (5). The present study emphasizes the threat associated with this mechanism in relation to the dissemination of carbapenemase genes among different *Acinetobacter* species in hospital environments.

Nucleotide sequence accession numbers. The sequences of plasmids pMMCU1 and pMMA2 were deposited in GenBank under nucleotide sequence accession numbers GQ342610 and GQ377752, respectively. Other plasmid sequences from outbreak clones were deposited under accession numbers GQ904226, GQ476987, and GQ904227.

This study was supported by the Spanish Network for Research on Infectious Diseases—REIPI (Instituto de Salud Carlos III, RD06/0008/0025 and RD06/0008/0011), Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI061368, PI081368, and PS09/00687), and SERGAS (PS07/90) and by grants from Xunta de Galicia (07CSA050916PR). Margarita Poza and Alejandro Beceiro are in receipt of Isidro Parga Pondal and Angeles Alvarino grants, respectively (research contracts from Xunta de Galicia).

REFERENCES

1. Bergogne-Berezin, E., and K. J. Towner. 1996. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical and epidemiological features. Clin. Microbiol. Rev. 9:148–165.

2. **Bou, G., A. Oliver, and J. Martínez-Beltrán.** 2000. OXA-24, a novel class D beta-lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:1556–1561.
3. **Bui, D., J. Ramiscal, S. Trigueros, J. S. Newmark, A. Do, D. J. Sherratt, and M. E. Tolmasky.** 2006. Differences in resolution of *mwr*-containing plasmid dimers mediated by the *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* XerC recombinases: potential implications in dissemination of antibiotic resistance genes. *J. Bacteriol.* **188**:2812–2820.
4. **Cornet, F., I. Mortier, J. Patte, and J. M. Louarn.** 1994. Plasmid pSC101 harbors a recombination site, *psi*, which is able to resolve plasmid multimers and to substitute for the analogous chromosomal *Escherichia coli* site *dif*. *J. Bacteriol.* **176**:3188–3195.
5. **D'Andrea, M. M., T. Giani, S. D'Arezzo, A. Capone, N. Petrosillo, P. Visca, F. Luzzaro, and G. M. Rossolini.** 2009. Characterization of pABVA01, a plasmid encoding the OXA-24 carbapenemase from Italian isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:3528–3533.
6. **Heritier, C., L. Poirel, P. E. Fournier, J. M. Claverie, D. Raoult, and P. Nordmann.** 2005. Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:4174–4179.
7. **Hwa, W. E., G. Subramaniam, P. Navaratnam, and S. D. Sekaran.** 2009. Detection and characterization of class 1 integrons among carbapenem-resistant isolates of *Acinetobacter* spp. in Malaysia. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **42**:54–62.
8. **Koh, T. H., L.-H. Sng, G. C. Y. Wang, L.-Y. Hsu, and Y. Zhao.** 2007. Carbapenemase and efflux pump genes in *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex strains from Singapore. *J. Antimicrob. Chemother.* **60**:1173–1174.
9. **Lee, K., Y. Chong, H. B. Shin, Y. A. Kim, D. Yong, and J. H. Yum.** 2001. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin. Microbiol. Infect.* **7**:88–91.
10. **Martí, S., J. Sánchez-Céspedes, M. D. Blasco, M. Ruiz, P. Espinal, V. Alba, F. Fernández-Cuenca, A. Pascual, and J. Vila.** 2008. Characterization of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-58 in an *Acinetobacter* genospecies 3 clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:2955–2958.
11. **Martí, S., J. Sánchez-Céspedes, M. D. Blasco, P. Espinal, M. Ruiz, V. Alba, and J. Vila.** 2008. Characterization of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-58 in an *Acinetobacter* phenon 6/ct13TU clinical isolate. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **61**:468–470.
12. **Ribera, A., F. Fernández-Cuenca, A. Beceiro, G. Bou, L. Martínez-Martínez, A. Pascual, J. M. Cisneros, J. Rodríguez-Baño, J. Pachón, and J. Vila.** 2004. Antimicrobial susceptibility and mechanisms of resistance to quinolones and beta-lactams in *Acinetobacter* genomic species 3. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1430–1432.
13. **Summers, D. K., and D. J. Sherratt.** 1984. Multimerization of high copy number plasmids causes instability: ColE1 encodes a determinant essential for plasmid monomerization and stability. *Cell* **36**:1097–1103.
14. **Summers, D. K., and D. J. Sherratt.** 1988. Resolution of ColE1 dimers requires a DNA sequence implicated in the three-dimensional organization of the *cer* site. *EMBO J.* **7**:851–858.
15. **Tolmasky, M. E., S. Colloms, G. Blakely, and D. J. Sherratt.** 2000. Stability by multimer resolution of pJHCMW1 is due to the Tn1331 resolvase and not to the *Escherichia coli* Xer system. *Microbiology* **146**:581–589.
16. **Val, M.-E., M. Bouvier, J. Campos, D. Sherrat, F. Cornet, D. Mazel, and F.-X. Barre.** 2005. The single-stranded genome of phage CTX is the form used for integration into the genome of *Vibrio cholerae*. *Mol. Cell* **19**:559–566.
17. **Walther-Rasmussen, J., and N. Hoiby.** 2006. OXA-type carbapenemases. *J. Antimicrob. Chemother.* **57**:373–383.
18. **Woodford, N., M. J. Ellington, J. M. Coelho, J. F. Turton, M. E. Ward, S. Brown, S. G. Amyes, and D. M. Livermore.** 2006. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int. J. Antimicrob. Agents* **27**:351–353.

3.3. Capítulo III. Secuenciación del genoma completo de la cepa de *A. baumannii* multirresistente AbH12O-A2 aislada durante el brote.

Gracias a los avances en las técnicas de secuenciación de genomas, un gran número de genomas y, en concreto de genomas bacterianos, han sido secuenciados en los últimos años. El gran número de genomas secuenciados en la actualidad facilita la aparición de estudios poblacionales y filogenéticos de *A. baumannii* así como una mejor comprensión de la plasticidad de su genoma, su historia natural, su epidemiología y la adquisición y pérdida de genes en relacionados con resistencia y patogenicidad.

En el presente capítulo, mediante técnicas de secuenciación Illumina y el posterior procesamiento de las secuencias obtenidas, se obtuvo la secuencia completa del genoma de la cepa de *Acinetobacter baumannii* AbH12O-A2 (código de acceso GenBank CP009534), siendo este el clon mayoritario del brote hospitalario que surgió en España entre los años 2006-2008. El genoma de esta cepa, está compuesto por 3,38 MB, tiene un contenido medio de CG del 39,4 % y consta de 3.526 secuencias codificantes.

La correspondiente publicación se adjunta a continuación:

Complete Genome Sequence of the Multiresistant *Acinetobacter baumannii* Strain AbH12O-A2, Isolated during a Large Outbreak in Spain

M. Merino,^a L. Alvarez-Fraga,^a M. J. Gómez,^b A. M. Aransay,^c J. L. Lavín,^c F. Chaves,^d G. Bou,^a M. Poza^a

Servicio de Microbiología, Instituto de Investigación Biomédica (INIBIC), Complejo Hospitalario Universitario (CHUAC), Sergas, A Coruña, Spain^a; Departamento de Microbiología Clínica, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain^b; Departamento de Evolución Molecular, Centro de Astrobiología INTA-CSIC, Madrid, Spain^c; Plataforma de Análisis Genómico CIC bioGUNE & CIBERehd, Derio, Spain^d

We report the complete genome sequence of *Acinetobacter baumannii* strain AbH12O-A2, isolated during a large outbreak in Spain. The genome has 3,875,775 bp and 3,526 coding sequences, with 39.4% G+C content. The availability of this genome will facilitate the study of the pathogenicity of the *Acinetobacter* species.

Received 3 October 2014 Accepted 6 October 2014 Published 13 November 2014

Citation Merino M, Alvarez-Fraga L, Gómez MJ, Aransay AM, Lavín JL, Chaves F, Bou G, Poza M. 2014. Complete genome sequence of the multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain AbH12O-A2, isolated during a large outbreak in Spain. *Genome Announc.* 2(6):e01182-14. doi:10.1128/genomeA.01182-14.

Copyright © 2014 Merino et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 3.0 Unported license](http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/).

Address correspondence to G. Bou, german.bou.avevalo@sergas.es, or M. Poza, margarita.poza.dominguez@sergas.es.

Acinetobacter baumannii is a major cause of hospital-acquired infections. Its success in the hospital environment lies in its genetic versatility and its ability to persist in extreme conditions. During 2006–2008, 377 patients were colonized/infected with multiresistant *A. baumannii* strains in a hospital in Madrid, Spain. This was one of the most important nosocomial outbreak produced by *A. baumannii* known to date (1, 2). The clones isolated during the outbreak harbored different plasmids, all containing a *bla*_{OXA-24} gene mobilized through a Xer recombination mechanism. Two mutations found to modify the gene expression of virulence factors provided an advantage to strain AbH12O-A2, whose genome sequence is described here. Previous studies have described the molecular mechanisms involved in the spread and epidemiology of this strain (1–6).

The total genomic DNA isolated from strain AbH12O-A2 was sheared into smaller fragments with the Covaris S/E210 system. Specific adapters were ligated to DNA fragments, and libraries containing inserts of 500 bp were purified and selectively enriched by PCR. After quality and quantity controls, 90 nucleotide fragments were paired-end sequenced in a HiSeq2000 system, with the TruSeq PE cluster kit version 3, cBot-HS, and TruSeq SBS kit-HS version 3 (Illumina Inc.). Once the gaps were identified, pairs of primers were designed and specific regions were amplified. Products were sequenced by BigDye Terminator version 3.1 chemistry in an ABI Seq Instrument (Applied Biosystems). After quality control of the raw data, clean data were aligned to *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978, as a reference sequence. Assembly of the short reads into the genome sequence was performed using the SOAPdenovo version 1.05 program (<http://soap.genomics.org.cn/soapdenovo.html>). Key parameter K setting at 47 is determined by optimal assembly according to the paired-end and overlap relationship via mapping reads to contigs.

The *A. baumannii* AbH12O-A2 complete genome consists of 3,875,775 bp with a G+C content of 39.4% and contains 3,526 coding sequences, 72 tRNA genes, and 6 rRNA clusters. *A. bau-*

mannii ACICU (score 518), *A. baumannii* AB900 (score 500), and *A. baumannii* AYE (score 483) were the closest neighbors to strain AbH12O-A2. Moreover, 56 genes associated with resistance to antibiotics and toxic compounds were found. The ResFinder bioinformatic application (7) was used to identify genes coding for antibiotic resistance. The following resistance genes were detected in the genome: *aac(3)-IIa*, *strA*, and *strB* conferring resistance to aminoglycosides; *bla*_{OXA-65}, *bla*_{ADC-25}, and *bla*_{TEM-1B} conferring resistance to β -lactams; and *sul2* conferring resistance to sulfonamides. Comparison of the AbH12O-A₂ genome with other completed genomes of *A. baumannii* by use of Mauve version 2.3.1 (8) revealed a resistance island (3,612,846–3,637,461 bp) flanked by two sequences of *ISAbal1* in opposite directions. PHAST (9) analysis revealed four putative intact phages integrated in the genome, two of which are similar to *Acinetobacter* phage *Bphi*-B1251 and another two that have not previously been identified in *A. baumannii*: one is similar to Enterobacteria phage *mEp235* and the other is similar to *Haemophilus* phage SuMu.

Nucleotide sequence accession number. This whole-genome shotgun project has been deposited in GenBank under accession number CP009534.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III—Ministerio Economía y Competitividad Unión Europea—Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) PI11/01034, awarded to M.P., and from the Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI) RD12/0015 awarded to G.B.), the Departamento de Desarrollo Económico y Competitividad del Gobierno Vasco (GV)—Etortek Research Programs 2011–2013 (EI11-300 and IE13-370), and the Diputación Foral de Bizkaia (DFB)—Departamento de Promoción Económica awarded to A.M.A. and J.L.L.

REFERENCES

- Acosta J, Merino M, Viedma E, Poza M, Sanz F, Otero JR, Chaves F, Bou G. 2011. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* harboring OXA-24

Merino et al.

- carbapenemase, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 17:1064–1067. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1706.091866>.
2. Merino M, Acosta J, Poza M, Sanz F, Beceiro A, Chaves F, 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. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:2724–2727. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01674-09>.
 3. Rumbo C, Fernández-Moreira E, Merino M, Poza M, Mendez JA, Soares NC, Mosquera A, Chaves F, 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*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:3084–3090. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00929-10>.
 4. Gayoso CM, Mateos J, Méndez JA, Fernández-Puente P, Rumbo C, Tomás M, Martínez de Ilarduya O, Bou G. 2014. Molecular mechanisms involved in the response to desiccation stress and persistence in *Acinetobacter baumannii*. *J. Proteome Res.* 13:460–476. <http://dx.doi.org/10.1021/pr400603f>.
 5. Mendez JA, Soares NC, Mateos J, Gayoso C, Rumbo C, Aranda J, Tomas M, Bou G. 2012. Extracellular proteome of a highly invasive multidrug-resistant clinical strain of *Acinetobacter baumannii*. *J. Proteome Res.* 11:5678–5694. <http://dx.doi.org/10.1021/pr300496c>.
 6. Soares NC, Spat P, Mendez JA, Nakedi K, Aranda J, Bou G. 2014. Ser/Thr/Tyr phosphoproteome characterization of *Acinetobacter baumannii*: comparison between a reference strain and a highly invasive multidrug-resistant clinical isolate. *J. Proteomics.* 102:113–124. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2014.03.009>.
 7. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, Aarestrup FM, Larsen MV. 2012. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J. Antimicrob. Chemother.* 67:2640–2644. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dks261>.
 8. Darling AC, Mau B, Blattner FR, Perna NT. 2004. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Res.* 14:1394–1403. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.2289704>.
 9. Zhou Y, Liang Y, Lynch KH, Dennis JJ, Wishart DS. 2011. PHAST: a fast phage search tool. *Nucleic Acids Res.* 39:W347–W352. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkr485>.

3.4. Capítulo IV. El sistema de secreción de dos componentes AbFhaB/AbFhaC-like está implicado en adherencia a superficies bióticas y en la virulencia de la cepa *Acinetobacter baumannii* AbH12O-A2.

En los últimos años *A. baumannii* se ha convertido en un patógeno muy relevante. Este hecho es debido al grave incremento del número de infecciones y brotes hospitalarios causados por este microorganismo, así como a la emergencia de fenotipos multirresistentes (5). Se han realizado múltiples estudios enfocados al estudio de la base genética y funcional de la resistencia a antimicrobianos en *A. baumannii*. Sin embargo, a pesar de la importancia clínica de las infecciones producidas por *A. baumannii*, los mecanismos de patogenicidad de este microorganismo son todavía muy poco conocidos, ya que hasta hace poco tiempo era considerada como una bacteria de baja virulencia.

La patogénesis bacteriana es un proceso en el que participan múltiples factores de virulencia. Existe una amplia variedad de fenotipos diferentes relacionados con virulencia en aislados clínicos de *A. baumannii* relacionados con la motilidad, la adherencia, la formación de biofilm, la invasividad o la citotoxicidad (29). Los factores de virulencia que participan en estos fenotipos virulentos incluyen mecanismos para la captación del hierro (139), la producción de enzimas hidrolíticas (140), mecanismos relacionados con el desarrollo de la cápsula, la producción de pili, expresión de proteínas de membrana externa o producción de vesículas de membrana externa (29, 90, 104).

La adhesión es el primer paso para que se desarrolle un proceso de colonización que puede derivar en infección. La adhesión puede darse sobre superficies bióticas (piel o tejidos de pacientes o personal hospitalario) o abióticas (material hospitalario, suelos, grifería,...etc). En algunas ocasiones, después de la adhesión puede producirse la formación de biofilm. Algunos de los factores implicados en la producción de biofilm han sido estudiados, tales como el sistema chaperone-usheer *CsuA/BABCDE*, la producción de poli- β -1-6-*N*-acetilglucosamina o la proteína *Bap* (90, 111, 113). Un estudio reciente, realizado con 52 cepas clínicas de *A. baumannii* reveló que la habilidad para formar biofilm y la capacidad para adherirse a células eucariotas son habilidades independientes (114). Este dato sugiere que *A. baumannii* posee distintos mecanismos implicados en la formación de biofilm y adherencia, siendo estos dos mecanismos regulados de forma independiente (114).

Los mecanismos implicados en la adherencia y formación de biofilm de cepas de *A. baumannii* en superficies bióticas están mucho menos estudiados que en superficies abióticas. Se sabe que la porina OmpA, además de participar en la formación de biofilm en superficies abióticas, facilita el proceso de adherencia a las células eucariotas (105). También se ha descrito que la proteína autotransportadora Ata participa en la formación de biofilm y facilita la unión de las bacterias a las moléculas de colágeno tipo IV de las células eucariotas (108).

Estudios fenotípicos de adherencia, motilidad y formación de biofilm de la cepa clínica de *A. baumannii* AbH12O-A2 revelaron que esta cepa poseía una extraordinaria capacidad de adherencia a superficies bióticas. Por ello, y mediante el estudio de la secuencia completa de su genoma (Capítulo III), nos propusimos buscar genes que pudieran estar implicados en este proceso. En una isla genómica de 18 Kb, no presente en la cepa de *A. baumannii* ATCC 17978, se localizó un sistema de secreción de dos componentes (AbFhaB/AbFhaC). Estos sistemas pertenecen al sistema de secreción tipo V y están compuestos por dos proteínas: una exoproteína larga y una proteína de membrana que se encarga de transportar al exterior la exoproteína.

Ya que *A. baumannii* AbH12O-A2 poseía una elevada capacidad de adherirse a células eucariotas y que este tipo de sistemas de secreción habían sido relacionados previamente con la adherencia a superficies bióticas, el objetivo principal de este capítulo consistió en demostrar su implicación en el proceso de adherencia de *A. baumannii* AbH12O-A2, así como determinar su papel en virulencia utilizando para ello dos modelos animales de infección.

Para ello, el gen codificante de la proteína transportadora AbFhaC fue eliminado mediante una técnica de doble recombinación para originar un mutante *knockout* isogénico derivado de la cepa clínica AbH12O-A2. Además, se extrajeron vesículas de membrana de *A. baumannii* AbH12O-A2 y de la cepa *knockout* y mediante estudios proteómicos, se demostró que ninguna de las dos proteínas del sistema de dos componentes estaba presente en la cepa mutante. Experimentos de adherencia de estas cepas a superficies bióticas demostraron que este sistema AbFhaB/AbFhaC facilita la adherencia a células eucariotas, siendo una de sus dianas celulares la proteína fibronectina. Por último, los experimentos realizados empleando modelos de infección animal en *Caenorhabditis elegans* y en ratones mostraron una disminución de la virulencia en la cepa mutante con respecto a la cepa salvaje.

Se concluye que el sistema AbFhaB/AbFhaC descrito en la cepa de *A. baumannii* AbH12O-A2 está implicado en adherencia a superficies bióticas y en virulencia.

El presente capítulo constituye un último manuscrito en preparación. A continuación se detallan los materiales y métodos y los resultados de dicho manuscrito.

3.4.1. Material y métodos del capítulo IV.

Cepas bacterianas, condiciones de cultivo, plásmidos y extracción de ADN

Acinetobacter baumannii AbH12O-A2 fue aislado a partir de un brote nosocomial que ocurrió durante los años 2006-2008 en el hospital 12 de Octubre de Madrid. Las bacterias *A. baumannii* y *E. coli* se cultivaron de manera rutinaria en medio LB. Se añadió agar al 2 % cuando fue necesario. Todas las cepas se cultivaron a 37 °C en agitación (180 rpm) y se congelaron a -80 °C en medio LB con 10 % de glicerol. La concentración de telurito sódico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) utilizada fue de 10 µg/mL para *E. coli* y de 30 µg/mL para *A. baumannii*. El ADN genómico se extrajo con el *Wizard Genomic DNA purification Kit* (Promega Corporation, Madison, WI, USA). El ADN plasmídico se extrajo con el *High Pure DNA Isolation Kit* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). *E. coli* TG1 se utilizó para las técnicas de clonación y la cepa de *A. baumannii* ATCC 17978 fue utilizada como control experimental en algunos casos. Para realizar el *knockout* mediante doble recombinación se utilizó el plásmido pMO130-Tel^R. El plásmido pWH1266, en el cual se introdujo el gen Tpm (locus_tag ACIAD2922) de *A. calcoaceticus* ADP1 junto con su secuencia promotora (141), se utilizó para complementar la cepa mutante.

Construcción de la cepa knockout

La cepa *knockout* AbH12O-A2ΔfhaC se construyó usando el plásmido pMO130-Tel^R que contiene los genes *xyIE*, *sacB* y los genes de resistencia a kanamicina y telurito. Este plásmido actuaría como vector suicida. Fragmentos de 608-889 pb, respectivamente, localizados en regiones anteriores y posteriores al dominio POTRA del locus LX00_12105 fueron clonados en el vector pMO130-Tel^R usando los oligonucleótidos descritos en la Tabla 1 del Anexo IV. El plásmido resultante se utilizó para transformar células de *A. baumannii* AbH12O-A2 por electroporación. Se seleccionaron las colonias recombinantes representantes del primer evento de recombinación usando la combinación de telurito y la detección visual de la actividad XylE después de espolvorear las colonias obtenidas con pirocatecol (142). Las colonias resistentes a telurito de color amarillo fueron cultivadas en medio LB líquido suplementado con 15 % de sacarosa y posteriormente sembradas en medio LB-agar. El segundo evento de recombinación se confirmó mediante PCR utilizando los oligonucleótidos detallados en la Tabla 1 del Anexo IV.

Complementación de la cepa knockout

Para complementar la cepa *knockout* AbH12O-A2 Δ fhaC, el gen diana se amplificó a partir del genoma de la cepa AbH12O-A2 utilizando los oligonucleótidos que aparecen en la Tabla 1 del Anexo IV. Posteriormente, se digirió y clonó en el sitio de restricción *Sall* del plásmido pWH1266-Tpm. Esta nueva construcción se utilizó para transformar la cepa *knockout*. Los transformantes se seleccionaron en placas de LB suplementado con 30 μ g/mL de telurito y se confirmaron mediante PCR usando los oligonucleótidos que aparecen en la Tabla 1 del Anexo IV

Extracción de ARN y real time RT-PCR

Para la extracción del ARN a partir de un cultivo líquido en fase exponencial se utilizó el *High Pure RNA Isolation kit* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Las muestras de ARN fueron tratadas con DNasa I y purificadas con *RNeasy MinElute Cleanup Kit* (Qiagen). Las muestras fueron cuantificadas usando un BioDrop μ LITE (Isogen Life Science). Para determinar los niveles de expresión de los genes de interés se llevó a cabo la técnica qRT-PCR utilizando sondas UPL (Roche). Se utilizó el kit *LightCycler 480 RNA Master hydrolysis probes* y un LightCycler 480 RNA (ambos de Roche, Germany). El programa utilizado fue el siguiente: incubación inicial a 65 °C, 3 min, seguido de una desnaturalización a 95 °C durante 30 s, 45 ciclos a 95 °C, 15 s y 60 °C, 45 s, y un paso de elongación final a 40 °C, 30 s. Se realizaron tres réplicas biológicas independientes. Los niveles de expresión se estandarizaron empleando el *housekeeping gyrB*. Los oligonucleótidos y sondas empleados aparecen en la Tabla 1 del Anexo IV.

Aislamiento y purificación de vesículas de membrana externa OMVs

La extracción de OMVs se realizó tal como describieron Méndez y col. (129). Las células bacterianas fueron centrifugadas (4000 rpm, 40 min a 22 °C). Los sobrenadantes se filtraron a través de membranas de 0,22 μ m de diámetro Millex-GP (Millipore, Bedford, U.S.A.), y posteriormente, se ultracentrifugaron (200000 \times g, 90 min, 4 °C, rotor 70 Ti Beckman, Munich, Germany). El pellet de OMVs se lavó y se resuspendió en PBS. Esta suspensión de vesículas se filtró de nuevo a través de membranas de 0,22 μ m (Millex-GP) y una pequeña fracción fue sembrada en placas de LB para descartar crecimiento bacteriano. El filtrado resultante fue utilizado para la extracción de las proteínas y posteriores análisis proteómicos. Se añadió ácido

tricloroacético (TCA) a la resuspensión de vesículas a una concentración final del 10 %, se mezcló bien y se realizó la incubación toda la noche a 4 °C con el fin de que las proteínas precipitasen. Las proteínas se centrifugaron 30 min a 16.000 × *g*, se lavaron dos veces en acetona helada y, posteriormente, el pellet proteico se secó al aire. Después, las proteínas fueron solubilizadas utilizando urea 6 M y tiourea 2 M en bicarbonato amónico 25 mM (pH 8,0). La concentración proteica final se determinó mediante un ensayo modificado de Bradford.

Digestión de las proteínas en solución

La digestión en solución se llevó a cabo tal y como describieron Méndez y col. (129). De forma resumida, los extractos proteicos se solubilizaron en una solución de urea 6 M y tiourea 2 M en bicarbonato amónico 25 mM y se añadió DTT a una concentración final de 10 mM. Estas muestras fueron incubadas durante 1 h a 37 °C. Posteriormente, se añadió iodoacetamida (IAA) a una concentración final de 50 mM y se mezcló bien para incubar las muestras 45 min a temperatura ambiente y absoluta oscuridad. Acto seguido se diluyeron las muestras 6 veces, con el fin de reducir la concentración de urea, se añadieron 2 unidades de tripsina (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) y se incubaron a temperatura ambiente toda la noche. Se analizaron dos muestras biológicas (extraídas a partir de las cepas de *A. baumannii* AbH12O-A2 y AbH12O-A2Δ*fhaC*). En todos los casos, la mezcla de péptidos obtenidos después de la digestión con tripsina se acidificó añadiendo 1 μL de 10 % TFA y desalando las muestras utilizando *stage-tips* hechos a mano (143) tal como se ha descrito previamente (144). Las muestras se dividieron en alícuotas y se evaporaron usando una centrífuga de vacío. Por último, se congelaron y se almacenaron a -80 °C.

Análisis de espectrometría de masas nanoLC-MALDI-TOF/TOF

Un total de 2 μg de la mezcla de péptidos desalada en el apartado anterior fue separado mediante cromatografía de fase reversa usando un cromatógrafo de líquidos nanoLC (ABSciex, MA, USA) y una columna de C18 (New Objective, Woburn, MA) con un diámetro interno de 300 Å. Los péptidos fueron eluidos con un flujo de 0,35 μL/min con 0,1 % de ácido trifluoroacético y un gradiente lineal de acetonitrilo de 1,9-38 % y de solución B (compuesta

por un 98 % de acetonitrilo y un 0,1 % trifluoroacético) durante 90 min. Los péptidos eluidos fueron mezclados con una matriz de α -cyano (4 mg/mL con un flujo de 1,2 μ L/min) y depositados en la placa de MALDI utilizando un *spoteador* automático (SunCollect, Sunchrome, Friedrichsdorf, Germany). La carrera de MS para cada cromatograma fue adquirida y analizada usando un espectrómetro de masas 4800 MALDI-TOF/TOF (ABSciex, MA, USA) y una intensidad láser de 3.800 kV de voltaje y una lectura de 1.500 disparos/espectro para el análisis de masas (MS). Para el análisis de MSMS la selección automatizada de precursores con un rango de masas de 800-4.000 m/z se llevó a cabo por el método de Job-wide (hasta 15 precursores/fracción, con una señal de ruido con un umbral inferior a 50) con un láser de 4.800 kV de voltaje y 1500 disparos/espectro. El rango de energía CID (*Collision-induced dissociation*) se fijó en el medio. Se realizó una segunda selección de precursores por el método Job-Wide, excluyendo los precursores fragmentados previamente y considerando una señal de ruido con un umbral inferior a 30 para poder identificar péptidos procedentes de proteínas que estuvieran en menor concentración. Los datos obtenidos o espectros de fragmentación obtenidos fueron procesados para la subsecuente identificación de proteínas.

Cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas utilizando una 5500 QTRAP (LC-MS/MS). Diseño experimental de selección de péptidos y análisis por proteómica dirigida mediante MRM (Multiple Reaction Monitoring)

Un total de 2 μ g de las muestras AbH12O-A2 y AbH12O-A2 Δ fhaC fueron inyectadas en un cromatógrafo de líquidos, tipo nanoLC (ABSciex, MA, USA) con un gradiente lineal de 120 min y acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuádrupolo/trampa iónica 5500QTRAP (ABSciex, MA, USA) para realizar una carrera cromatográfica e identificar las proteínas presentes en la mezcla mediante un EM ER (*Enhanced MS and Enhanced resolution*). Un total de 2 μ g de la mezcla de péptidos fueron inyectados en una pre-columna (C18, 5 μ m, 300 Å, 100 μ m x 2 cm, Acclaim PepMap, Thermo Scientific, USA) con un flujo de 3 μ L/min durante 10 min para el desalado y luego fueron separados en una nanocolumna C18 (75 μ m id, 15 cm, 3 μ m, Acclaim PepMap 100, Thermo Scientific, USA) a un ratio de flujo de 300 nL/min. El gradiente para la elución de los péptidos para determinar el método de EM ER empezó con un 5 % de solución B (0,1 % ácido fórmico en 95 % acetonitrilo) durante 3 min, desde el minuto 3 hasta 120 min con un 40 % de solución B, con 95 % de solución B durante 10 min y, finalmente, se equilibró la columna durante 15 min con 5 % de solución B, como se indica en la Tabla 2 del

Anexo IV. De esta manera se identificaron las proteínas de estudio y se seleccionaron los mejores péptidos. Estos péptidos tienen que ser proteotípicos (únicos para una proteína en particular) con una buena señal espectral, sólo péptidos plenamente trípticos, y con un tamaño entre 8 y 30 aminoácidos, carentes de residuos de metionina y triptófano. Una vez seleccionados los péptidos se desarrolló el método de proteómica dirigida por MRM (*multireaction monitoring*), durante el cual se estudiaron tres péptidos para cada proteína y tres o cuatro transiciones para cada péptido. El gradiente para la elución de los péptidos con el método MRM empezó con un 5 % de solución B (0,1 % ácido fórmico en 95 % acetonitrilo) durante 3 min, desde el min 3 hasta los 45 min, un 35 % de solución B durante 1 min hasta un 95 % de solución B durante 10 min y, finalmente, se equilibró la columna durante 15 min con un 5 % de solución B como se indica en la Tabla 2 del Anexo IV. El espectrómetro de masas tiene una *interface* de tipo nanospray que consiste en un emisor de silica de 20 μm diámetro interno con una punta de 10 μm (NewObjective, Woburn, MA). Para estos análisis se trabajó en modo positivo. Los parámetros de adquisición del espectrómetro fueron los siguientes: voltaje de *ion spray* 2.600 V, la *interface heater temperature* (IHT) 150 °C, *ion source gas 2* (GS2) fue 0, *curtain gas* (CUR) fue 20 y *ion source gas 1* (GS1) fue 25 *psi* con una *collision gas* (CAD) elevada. Los parámetros de masas que dependen del componente de estudio fueron 10 para el potencial de entrada (EP) y 15 para el *Collision cell exit potential* (CXP). La energía de colisión (CE) y el potencial *declusterin* (DP) fueron determinados de forma teórica para cada péptido mediante el software libre Skyline (Mac Coss lab). Q1 and Q3 se optimizaron como unidad/unidad a una resolución (0,7 Da) y la pausa entre los diferentes rangos de masas fue establecida como 3 ms.

Análisis de datos

Para los experimentos con Nano-LC-MALDI-TOF/TOF y nanoLC-5500 QTRAP, los datos crudos se procesaron usando el software informático Protein Pilot 4.0 (ABSciex, MA, USA). Los péptidos se identificaron a través de una base de datos realizada con todas las proteínas descritas en la cepa AbH12O-A2 (3.635 proteínas cuyos códigos de acceso van desde A1S4698.1 hasta A1S8323.1). Los parámetros de búsqueda fueron los siguientes;

Alquilación de cisteínas: iodoacetamida

Digestión: tripsina

ID focus: modificaciones biológicas

Database: nr

Filtrado específico: no.

El Protein Pilot utilizó el algoritmo Paragon para hacer las búsquedas y para los experimentos con el TOF-MS/MS se aplicaron los criterios de confianza Detection Protein Threshold; Unused ProtScore (Conf) > 1,3 (95,0 %). En el caso de la 5500 QTRAP, los espectros obtenidos fueron de peor calidad por lo que las búsquedas de proteínas identificadas se realizaron con una confianza más baja Detection Protein Threshold; Unused ProtScore (Conf) > 0,05 (10,0 %).

Adherencia a células epiteliales humanas

Las células epiteliales alveolares humanas A549 y Hela fueron cultivadas en 5 % CO₂ a 37 °C en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma-Aldrich) suplementado con 10 % de suero bovino fetal inactivado (FBS) y un 1 % penicilina-estreptomicina (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Las células fueron sembradas formando monocapas confluentes en placas de 24 pocillos para posteriormente ser sometidas a dos lavados con suero salino y una solución salina equilibrada Hank's (mHBSS, igual que HBSS pero sin glucosa) siguiendo las instrucciones previamente descritas (145). Después, las células epiteliales fueron infectadas con 10⁴ bacterias por pocillo e incubadas durante 24 h en mHBSS a 37 °C. Para determinar el número de bacterias adheridas, la monocapa de células infectada fue lavada tres veces con suero salino para eliminar las bacterias no adheridas y después se lisaron con 500 µL de deoxicolato sódico al 0,5 %. Se sembraron diluciones seriadas de los lisados en placas de LB y se incubaron a 37 °C durante 24 h. Se realizó el recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) para determinar el porcentaje de bacterias adheridas a las células epiteliales comparándolo con el control de crecimiento. Se realizaron seis réplicas independientes. La significancia estadística se evaluó utilizando el test T de Student.

Polarización de células epiteliales alveolares humanas A549 y posterior infección con A. baumannii para SEM

Las células alveolares humanas fueron mantenidas de rutina en frascos de cultivo de tejidos de 25 cm² (BioLite 25 cm² Flask, Thermo Fisher Scientific, Rochester, New York) en

medio DMEM (Cellgro Mediatech Inc, Manassas, Virginia) suplementado con 10 % de FBS inactivado (Cellgro Mediatech Inc, Manassas, Virginia) y un 1 % de 100 µg/mL de penicilina-estreptomicina (Cellgro Mediatech Inc, Manassas, Virginia). Las placas *transwell* con membrana de policarbonato de 24 pocillos (Costar Transwell Polyester Supports, Corning Inc, Corning, New York) fueron pre-acondicionadas durante las 24 h previas a la siembra en DMEM por ambos lados de la membrana e incubadas a 37 °C y 5 % CO₂. El medio DMEM se eliminó de la placa *transwell* y 10⁵ células A549 fueron sembradas en cada membrana. Las células A549 fueron mantenidas sumergidas DMEM en las membranas de las placas *transwell* durante una semana. Tras una semana sumergidas, el DMEM fue eliminado de la parte superior de la membrana para permitir que las células A549 se polarizaran y comenzaran a secretar surfactante. Las células fueron polarizadas durante dos semanas para crear un sellamiento acuoso alrededor de la membrana. Un día antes y durante la infección, las células A549 fueron alimentadas con DMEM suplementado con 10 % de FBS inactivado sin penicilina-estreptomicina (DMEM -). Las bacterias, previamente cultivadas en LB a 37 °C durante 24 h en un incubador en agitación a 180 rpm, fueron lavadas y resuspendidas en medio HBSS (Hyclone Laboratories, Inc, Logan, Utah). Un total de 10² bacterias fueron depositadas en la superficie apical de las células A549, pipeteando 1 µL de la suspensión en el centro de cada membrana. Después, la placa *transwell* se incubó y se mantuvo durante 72 h a 37 °C y 5 % CO₂. Después de 72 h se lavaron las membranas con HBSS para eliminar secreciones y células bacterianas no adheridas. Las membranas se fijaron durante 24 h en 4 % de formaldehído-HBSS a 4 °C. Las membranas fueron recuperadas para SEM usando la metodología previamente descrita (111).

Ensayos de unión a fibronectina

El primer paso consistió en el tapizado de placas de 96 pocillos con fibronectina tal como se ha descrito previamente (124). Los pocillos se tapizaron con 1,25 µg de fibronectina disuelta en PBS (125 µL de fibronectina a una concentración de 10 µg/mL por pocillo) o con 20 µg/ µL de BSA o PBS (ambos utilizados como controles) y se incubaron toda la noche a 4 °C. Después, los pocillos se lavaron 4 veces con 125 µL de BSA en PBS a una concentración del 1 % peso/volumen y se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente con 1 % de BSA en PBS. A continuación, los pocillos se lavaron 6 veces con PBS.

Los ensayos de adherencia a fibronectina se realizaron tal como se describió previamente (124, 146). De forma resumida, la cepa de *A. baumannii* AbH120-A2 y sus

derivados isogénicos crecieron en medio LB a 37 °C y en agitación a 180 rpm. Las bacterias se lavaron tres veces y posteriormente se resuspendieron en el doble del volumen inicial en PBS estéril. Alícuotas de 100 µL de las suspensiones bacterianas fueron añadidas a cada uno de los pocillos tapizados con fibronectina, BSA o no tapizados. Después de 3 h a temperatura ambiente, las bacterias no adheridas fueron descartadas y los pocillos se lavaron seis veces con PBS estéril. Las bacterias adheridas a los pocillos fueron recogidas con 125 µL de PBS con 0,5 % de Tritón X-100. Se sembraron diluciones seriadas de las suspensiones en placas de LB y se incubaron a 37 °C durante 24 h. Se realizó el recuento de UFCs para determinar el porcentaje de bacterias adheridas a la fibronectina inmovilizada comparándolo con el control. La significancia estadística se evaluó utilizando el test T de Student.

*Ensayos de virulencia en *Caenorhabditis elegans**

Los ensayos de virulencia utilizando el gusano *Caenorhabditis elegans* se realizaron tal y como describieron Vallejo y col. (147). Los huevos de la variedad de *C. elegans* N2 Bristol se incubaron en medio M9 y se detuvo el cultivo en el estadio de crecimiento L1 durante 24 h a 16 °C. Posteriormente, los gusanos se colocaron en placas con medio NGM o PGS modificado (0,5 % peptona, 0,5 % NaCl, 0,5 % glucosa y 75 mM sorbitol) que contenía bacterias. Un gusano en estadio de crecimiento L4 se situó en placas sembradas con la cepa de *A. baumannii* AbH2O-A2 o sus derivados isogénicos. Después de tres días, los gusanos se retiraron diariamente y se situaron en una nueva placa sembrada con la misma cepa bacteriana. Para estudiar la fertilidad de los gusanos, se contó el número de gusanos después de 24 h a 25 °C. Para ello, se utilizó una lupa Nikon SMZ-745. Se realizaron seis réplicas independientes de cada cepa. Se utilizó el test estadístico T de Student para evaluar las diferencias encontradas.

Ensayos de virulencia en un modelo de infección sistémica.

Se evaluó la virulencia de *A. baumannii* AbH12O-A2 y la cepa *knockout* AbH12O-A2ΔfhaC en términos de mortalidad y tiempo de supervivencia de ratones infectados usando un modelo murino de infección descrito previamente (120). Todos los experimentos desarrollados con ratones fueron aprobados por el Comité Ético Animal del Hospital de A Coruña. Durante los experimentos, se les suministró a los ratones *ad libitum* comida libre de

antibióticos y agua autoclavada. Se utilizaron grupos de 18 hembras de ratones BALB/c, con un peso 20-25 g y entre 6-9 semanas de edad. Se les inyectó de forma intraperitoneal una dosis con 250 μ L de suspensión bacteriana obteniéndose 33×10^7 UFC/ratón para la cepa AbH12O-A2 y 46×10^7 UFC/ratón para la cepa mutante AbH12O-A2 Δ fhaC. Los ratones se monitorizaron cuidadosamente durante 7 días buscando signos de enfermedad. Los animales que sobrevivieron a los 7 días fueron sacrificados con tiopental. Los datos de supervivencia fueron comparados usando el test estadístico Log Rank, que considera un P valor inferior a 0,05 como estadísticamente significativo.

Análisis Bioinformáticos

Para alinear y comparar genomas completos se utilizó el software MAUVE versión 2.3.1 (148). El programa Interpro se utilizó para realizar análisis funcionales de proteínas (149). La estructura tridimensional de las proteínas fue determinada usando el servidor informático Phyre2 (150). El programa VectorNT11 se utilizó para analizar secuencias de ADN y construcciones genéticas.

3.4.2. Resultados del capítulo IV.

Acinetobacter baumannii AbH12O-A2 tiene una alta capacidad de adherencia a células epiteliales humanas.

La cepa clínica de *A. baumannii* AbH12O-A2 fue considerada como el clon mayoritario durante un brote nosocomial que ocurrió en Madrid (2006-2008) durante más de 30 meses. Se ha demostrado que esta cepa de *A. baumannii* tiene la habilidad de sobrevivir y persistir durante largos períodos de tiempo en diferentes áreas hospitalarias (151). Se realizaron diferentes estudios fenotípicos con el fin de averiguar las estrategias moleculares que juegan un importante papel en la persistencia y en el potencial infectivo de la cepa *A. baumannii* AbH12O-A2 (101, 129, 152-154).

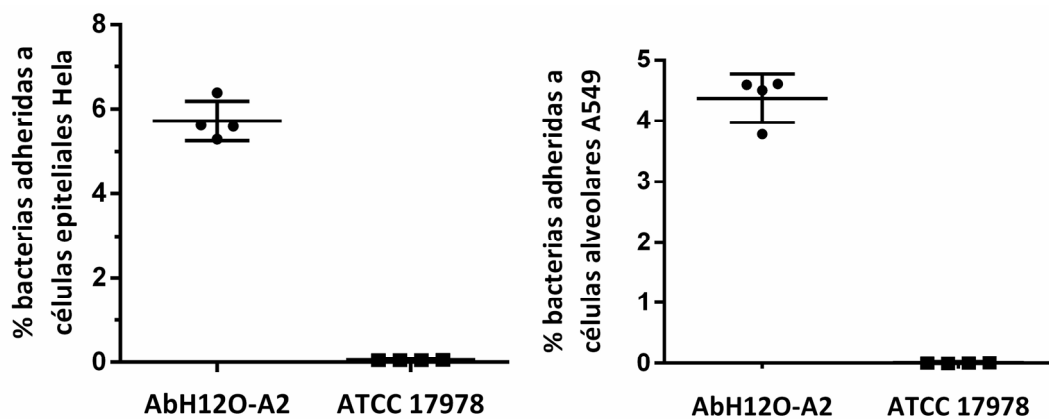


Figura 1. Experimentos de adherencia a células epiteliales alveolares A549 y HeLa de las cepas de *A. baumannii* AbH12O-A2 y ATCC 17978. Se realizaron cuatro réplicas independientes. Las muestras se analizaron con el test estadístico t-student. Las barras representan la desviación estándar.

Los experimentos de adherencia mostraron que la cepa clínica AbH12O-A2 se adhiere 500 veces más a células epiteliales alveolares A549 y 100 veces más a células epiteliales HeLa que la cepa de referencia *A. baumannii* ATCC 17978 (Figura 1). Estos datos podrían explicar en parte la habilidad de esta cepa de *A. baumannii* para causar un brote nosocomial durante tanto tiempo.

A. baumannii AbH12O-A2 presenta una isla genómica relacionada con adherencia.

La excelente habilidad de la cepa clínica *A. baumannii* AbH12O-A2 de adherirse a células epiteliales humanas (Figura 1), y la disponibilidad del genoma completo de esta cepa (GenBank CP009534.1) descrito en el capítulo III (153), nos motivó a realizar una búsqueda de aquellos genes que podrían estar implicados en el fenotipo de adherencia. El análisis genómico determinó una región de ADN que no estaba presente en genomas completos secuenciados de otras cepas de *A. baumannii*. La Figura 2A muestra esta región que comprendía 18.125 pb del genoma de *A. baumannii* AbH12O-A2 y se encontraba localizada entre el locus LX00_12060 en el extremo 5' que codifica un regulador transcripcional tipo LuxR, y el locus LX00_12110 en el extremo 3' que codifica una ARNt-Trp. Además, en los extremos 5' y 3' de la región genómica se encontraron unas secuencias duplicadas en el mismo sentido (AAAAAGCTCC- 6 pb- AGGAGCTTT). Dentro de esta región de ADN se identificaron 8 secuencias codificantes: el locus LX00_12065 que codifica un regulador transcripcional de la familia TetR (AIS07096.1), los loci LX00_12075, LX00_12080, LX00_12085, LX00_12090, LX00_12095 que codifican proteínas hipotéticas (AIS07097.1, AIS07098.1, AIS07099.1, AIS07100.1 y AIS07101.1, respectivamente), el locus LX00_12100 que codifica una proteína de adhesión (AKB90480) y el locus LX00_12105, que codifica una proteína de membrana (AIS07102.1).

El análisis detallado utilizando diversas herramientas bioinformáticas reveló la presencia de un sistema de secreción de dos componentes (TPS), codificado por los loci LX00_12100 y LX00_12105 (Figura 2B). El gen LX00_12100 se ha descrito que codifica una exoproteína de 392,72 KDa que contiene un péptido señal de 25 aminoácidos característico de los sistemas de secreción tipo V. El análisis más detallado de la secuencia aminoacídica, reveló la existencia de un dominio con actividad hemaglutinante dispuesto entre los aminoácidos 101 y 221 del extremo N-terminal de la exoproteína. Este dominio altamente conservado pertenece al dominio TPS de las proteínas tipo TpsA (código InterPro IPR008638). Múltiples copias de repeticiones de 20 residuos, descritos previamente en proteínas de este tipo, fueron determinadas a lo largo de toda la secuencia (código InterPro IPR010069). Entre las posiciones aminoacídicas 2.029 y 2.031 se describió un triplete peptídico Arg-Gly-Asp (RGD), el cual ha sido relacionado con adherencia en otras proteínas. El locus LX00_12105 codifica una proteína de membrana externa de 65,54 KDa (TpsB), la cual pertenece a la familia de proteínas transportadoras Omp85/TpsB. Esta proteína contenía un péptido señal de 25 aminoácidos y un

domino POTRA 2 (*polypeptide transport-associated*, con código InterPro IPR005565) localizado entre los aminoácidos 87 y 166.

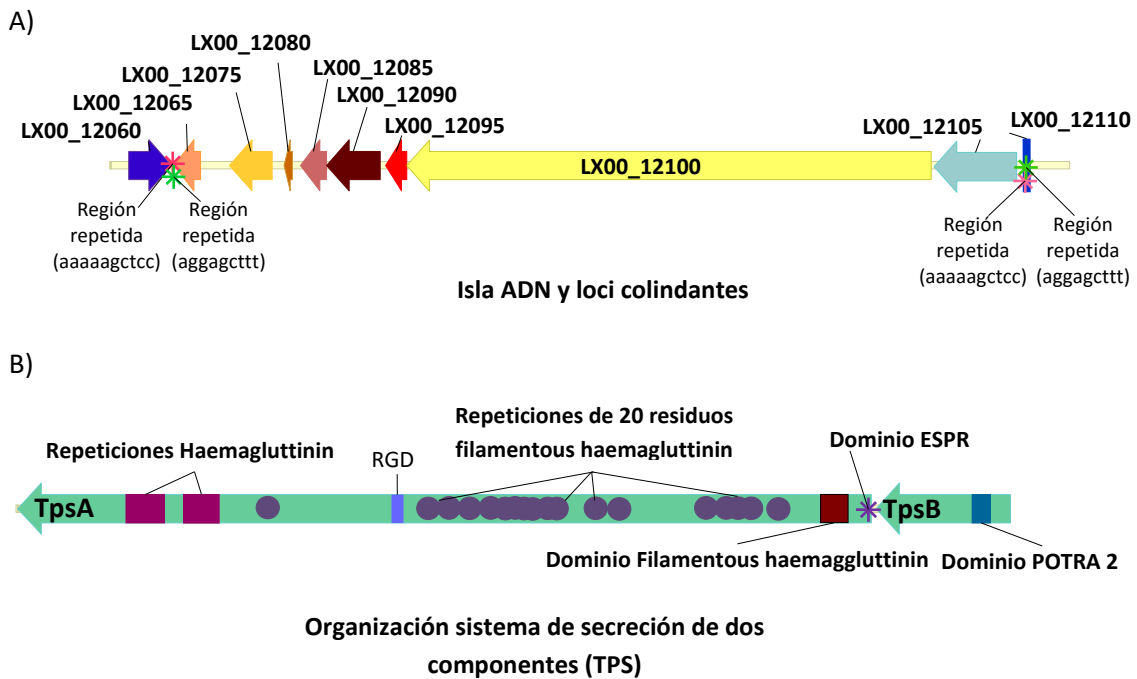


Figura 2. Organización y orientación genética de la isla genómica de aprox. 18 Kb encontrada en el genoma de la cepa *A. baumannii* AbH120-A2. Las secuencias codificantes se representan con flechas. Los asteriscos indican las regiones repetidas. B) Representación de los genes FhaC/FhaB del sistema de secreción de dos componentes (sistema TPS) descritos en el genoma de la cepa *A. baumannii* AbH120-A2. Las secuencias codificantes se representan con flechas. Los cuadrados indican los dominios conservados de la secuencia, los círculos representan secuencias repetidas a lo largo del genoma y el asterisco representa el péptido señal.

La estructura de la secuencia aminoacídica del locus LX00_12100 no se describió, debido a que el programa Phyre2 no es capaz de analizar secuencias aminoacídicas superiores a 1200 aminoácidos. El análisis de la secuencia aminoacídica del locus LX00_12105 con Phyre2 sugirió que esta proteína presentaba una estructura similar (100 % de confianza y un 86 % de cobertura) a la proteína FhaC de *Bordetella pertussis*, siendo un miembro de la familia de proteínas transportadoras OMP85/TPSB2.

Obtención de la cepa mutante AbH120-A2ΔfhaC.

Con el fin de estudiar la implicación del sistema de secreción de dos componentes en la patogénesis de la cepa clínica AbH120-A2 se realizó la construcción de la cepa *knockout* AbH120-A2ΔfhaC mediante la eliminación del dominio POTRA 2 del locus LX00_12105

utilizando el vector pMo130Tel^R. La eliminación de este fragmento de ADN del cromosoma de la cepa AbH12O-A2 fue confirmada mediante PCR. Además, los resultados de qRT-PCR confirmaron la nula expresión del gen LX00_12105 en la cepa mutante AbH12O-A2ΔfhaC.

La cepa mutante AbH12O-A2ΔfhaC no produce las proteínas AbFhaB y AbFhaC.

Se estudió mediante dos técnicas proteómicas el perfil proteico de las vesículas de membrana externa extraídas de cultivos tanto de la cepa clínica AbH12O-A2 como de la cepa mutante AbH12O-A2ΔfhaC. Los péptidos se detectaron y se identificaron en una base de datos con el fin de confirmar si la delección del gen *fhaC* tenía un efecto en la producción del gen *fhaB* y, finalmente, en la inactivación del sistema de secreción de dos componentes AbFhaB/AbFhaC.

Así, mediante la cromatografía acoplada a MALDI-TOF/TOF, se identificaron 209 proteínas procedentes de la muestra de la cepa clínica AbH12O-A2 y 166 proteínas procedentes de la muestra de la cepa mutante isogénica AbH12O-A2ΔfhaC. Las proteínas identificadas en ambas muestras, concordaban mayoritariamente con las publicadas por Méndez y col. (129). En las muestras de la cepa clínica AbH12O-A2 la proteína AbFhaB fue identificada con cuatro péptidos: ITHETGTVTPSYGSYGGK, VSATQANIQANQFTDR, IGGSLDSQWHAQGTAQQVNNR y GLISSLDQLTIQGQQDNNR, todos ellos con una confianza del 99 %. La proteína AbFhaC no fue identificada con esta técnica en las muestras de la cepa clínica AbH12O-A2. El hecho de que no se identifiquen péptidos de esta proteína, podría deberse a su elevada hidrofobicidad. En las muestras de la cepa mutante isogénica AbH12O-A2ΔfhaC no se identificó ningún péptido de las proteínas AbFhaB y AbFhaC.

Mediante las aproximaciones proteómicas por EM ER se identificaron 43 proteínas de procedentes de muestras de la cepa clínica y 55 proteínas procedentes de muestras de la cepa mutante isogénica AbH12O-A2ΔfhaC. La proteína AbFhaB fue identificada en las dos muestras utilizando como base de datos todas las proteínas de la cepa AbH12O-A2 (códigos de acceso del GenBank A1S04698.1-A1S8323.1). Cuando se utilizó una base de datos específica para estas dos proteínas (FhaBFhaC_M.fasta), ambas, AbFhaB y AbFhaC, fueron identificadas, a través del análisis de varios péptidos proteotípicos, en la cepa clínica AbH12O-A2. En la cepa mutante AbH12O-A2ΔfhaC, ninguna de estas dos proteínas fue identificada usando ambas bases de datos.

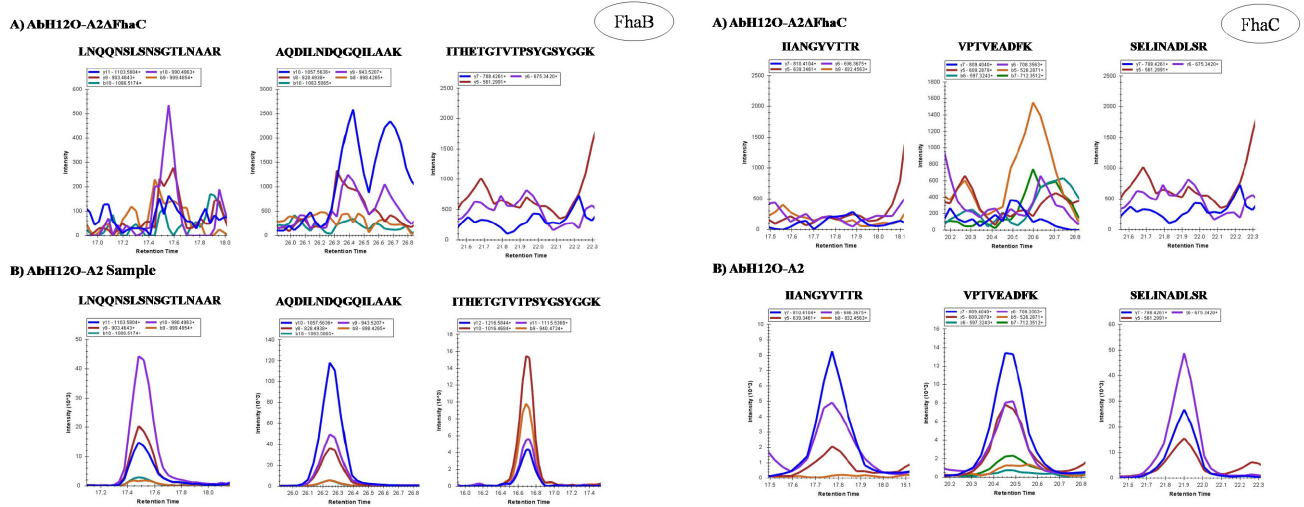


Figura 3. A) identificación de los péptidos trípticos utilizando la técnica de SRM/MRM. Cromatograma iónico (XIC) de los 3 péptidos de la proteína AbFhaB en la cepa mutante AbH120-A2ΔfhaC y en la cepa clínica AbH120-A2. Los péptidos endógenos identificados fueron LNQNSLSNSGTLNAAR, LNQNSLSNSGTLNAAR e ITHETGTVTPSYGSYGK con carga+2. El nombre de las transiciones para cada péptido aparece en la leyenda. B) identificación de los péptidos trípticos utilizando la técnica de SRM/MRM. Cromatograma iónico (XIC) de los 3 péptidos de la proteína AbFhaC en la cepa mutante AbH120-A2ΔfhaC y en la cepa clínica AbH120-A2. Los péptidos endógenos identificados fueron IIANGYVTR, VPTVEADFK y SELINADLSR con carga +2. El nombre de las transiciones para cada péptido aparece en la leyenda.

Los mejores péptidos proteotípicos de ambas proteínas detectados en las muestras de la cepa clínica AbH120-A2 con EM ER fueron elegidos para crear el método MRM. Los péptidos elegidos para detectar la proteína AbFhaB fueron LNQNSLSNSGTLNAAR, LNQNSLSNSGTLNAAR e ITHETGTVTPSYGSYGK. Para detectar la proteína AbFhaC, los péptidos elegidos fueron IIANGYVTR, VPTVEADFK y SELINADLSR. En las muestras de la cepa clínica AbH120-A2, la proteína AbFhaB fue identificada con IDA usando el software ProteinPilot con muy buen score (los péptidos presentaban una confianza superior al 95 %), la proteína AbFhaC era minoritaria y no se identificó con IDA. Sin embargo, se identificaron sus péptidos y sus espectros de fragmentación presentando una menor confianza. También se detectó la co-elución de, al menos, tres transiciones para cada péptido, lo que indicó presencia de esta proteína. Las co-eluciones de las transiciones de cada péptido de las muestras de la cepa clínica AbH120-A2 y de la cepa mutante AbH120-A2ΔfhaC se muestran en la Figura 3. En las muestras de la cepa mutante AbH120-A2ΔfhaC ninguna de estas dos proteínas fueron identificadas. No existe co-elución de transiciones de los péptidos en los tiempos de retención a los que co-eluyen en las muestras de la cepa clínica AbH120-A2. No se obtienen datos de fragmentación de estas proteínas.

El sistema de secreción de dos componentes AbFhaB/AbFhaC está implicado en adherencia a células eucariotas humanas en la cepa de A. baumannii AbH12O-A2.

Se examinó la interacción de la cepa clínica AbH12O-A2 y sus cepas derivadas con las células eucariotas. Para evaluar el papel de este sistema de dos componentes AbFhaB/AbFhaC en la adherencia a células eucariotas se utilizó la cepa de AbH12O-A2ΔfhaC (Figura 4A). Para ello, se utilizaron dos líneas de células epiteliales humanas. Células epiteliales alveolares humanas A549 y células epiteliales HeLa fueron infectadas con la cepa de clínica AbH12O-A2, la cepa mutante AbH12O-A2ΔfhaC, la cepa AbH12O-A2ΔfhaC con el plásmido pWH1266Tpm vacío y la cepa mutante AbH12O-A2ΔfhaC complementada con fhaC durante 24 h.

Tal como se aprecia en la Figura 4A, después de 24 h de incubación el porcentaje de bacterias de la cepa clínica AbH12O-A2 adheridas a la monocapa de células A549 y HeLa fue del 3,97 % y 5,72 %, respectivamente. La Figura 4A también muestra que la capacidad adherente de la cepa clínica AbH12O-A2 decreció significativamente del orden de 7 y 2 veces menos en las células epiteliales A549 y HeLa, respectivamente, cuando se eliminó el gen *fhaC*, recogiendo el 0,58 % y 3,12 % de bacterias adheridas, respectivamente (*P* valor < 0,0001). El fenotipo original fue restaurado empleando la cepa mutante AbH12O-A2ΔfhaC complementada, recogiendo un porcentaje de células adheridas correspondiente al 3,45 % y 7,15 % de las bacterias inoculadas, respectivamente (*P* valor < 0,0001).

Se utilizó microscopía electrónica de barrido (SEM) para visualizar la adherencia de las bacterias a las células alveolares humanas A549. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4B. Las observaciones microscópicas apoyaron los resultados previos de adherencia. En ellas se muestra una reducción en la adherencia a células epiteliales A549 de la cepa de AbH12O-A2 deficiente en el gen *fhaC*. La cepa parental mostró un mayor fenotipo de adherencia y causó un daño mayor a las células polarizadas A549 cuando lo comparamos con el mutante AbH12O-A2ΔfhaC. En la micrografía c, Figura 4B, se aprecia una capa de células eucariotas sin bacterias (control negativo) en el que se ve la monocapa de células intactas recubiertas de una capa de surfactante. Después de 72 h de infección con la cepa mutante AbH12O-A2ΔfhaC se encontró surfactante en la monocapa de células polarizadas A549 (micrografía b) mientras que el surfactante desapareció y la monocapa de células fue parcialmente destruida cuando la monocapa de células polarizadas A549 se infectó con la cepa clínica parental (micrografía a).

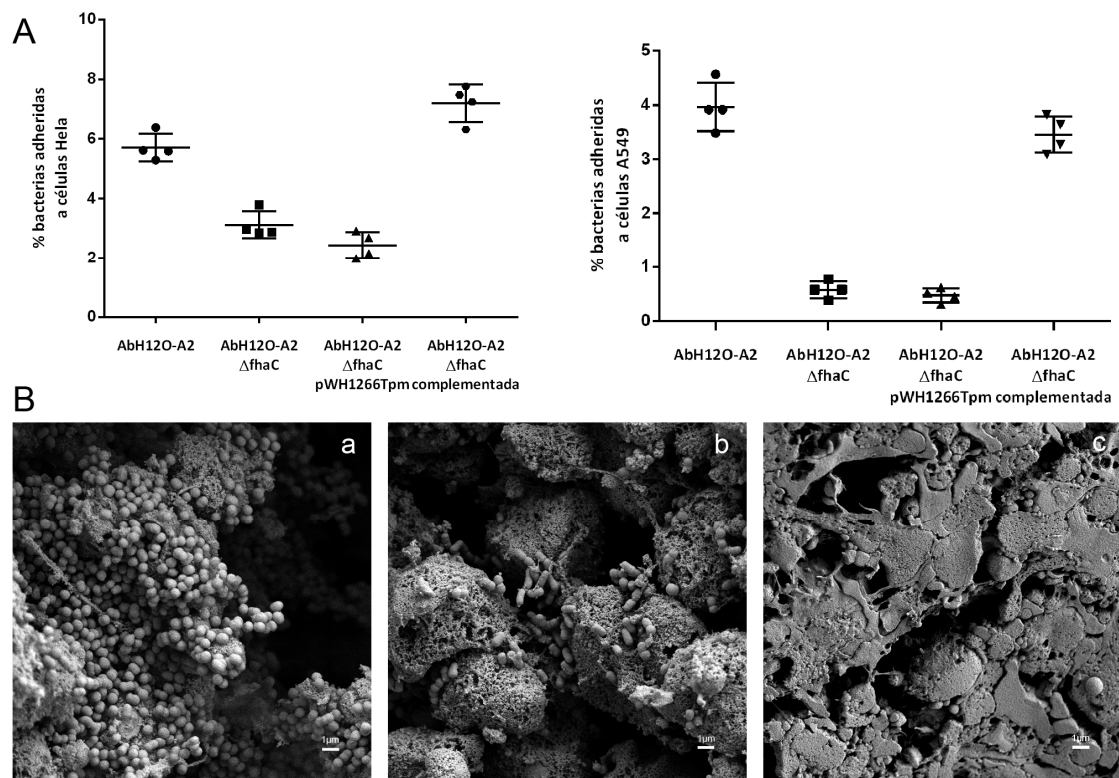


Figura 4. A) Experimento de adherencia a células epiteliales humanas HeLa y células alveolares humanas A549 utilizando las cepas AbH120-A2, la cepa derivada knockout isogénica AbH120-A2 Δ fhaC y la cepa mutante complementada (AbH120-A2 Δ fhaC complementada). Se utilizó una cepa mutante portadora del plásmido pWH1266Tpm vacío como control experimental (AbH120-A2 Δ fhaC + pWH1266Tpm). Se realizaron 6 réplicas independientes. Los resultados fueron analizados con el test estadístico t-student. Las barras indican la desviación estándar. B) Microscopía electrónica de barrido de células epiteliales alveolares humanas (A549) infectadas con *Acinetobacter baumannii*. a) Células de *A. baumannii* AbH120-A2 causando serios daños a las células A549. b) Células de *A. baumannii* AbH120-A2 Δ fhaC sobre la monocapa de células A549. Se aprecia menor daño en la monocapa. c) Control negativo sin bacteria en el que se aprecia la monocapa de células intacta recubierta de una capa de surfactante. Todas las micrografías fueron tomadas a 10.000 aumentos.

El sistema de dos componentes AbFhaB/AbFhaC de la cepa A. baumannii AbH120-A2 interacciona con la fibronectina de células humanas.

La adhesión a proteínas de la matriz extracelular, tales como la fibronectina, puede tener un papel importante en la adherencia e internalización bacteriana. Se realizó un análisis de la interacción del sistema de dos componentes AbFhaB/AbFhaC con la fibronectina incubando la cepa clínica AbH120-A2 y sus derivados mutantes en pocillos de poliestireno tapizados con fibronectina.

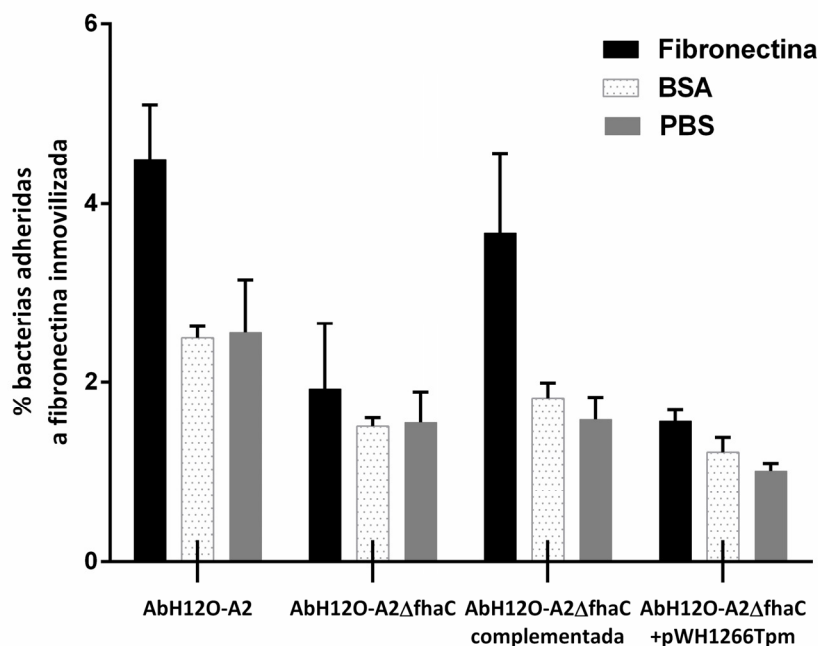


Figura 5. Unión de *A. baumannii* AbH120-A2 y sus mutantes derivados isogénicos a fibronectina inmovilizada. Los experimentos se realizaron con cuatro réplicas independientes de cada muestra y los resultados fueron analizados con el test estadístico t-student. Las barras de error representan la desviación estándar.

La cepa de *A. baumannii* AbH120-A2 se adhirió dos veces más a los pocillos de poliestireno tapizados con la proteína fibronectina que a los pocillos tapizados con la proteína BSA o a los pocillos no tapizados (Figura 5). Además, cuando se produjo la eliminación del gen *fhaC* en la cepa AbH120-A2 se observó una significativa reducción del número de bacterias adheridas a los pocillos tapizados con fibronectina. La capacidad de adherencia de la cepa mutante a la fibronectina fue 2,37 veces menor que el encontrado en el caso de la cepa salvaje (P valor = 0,0018). El fenotipo salvaje se restauró parcialmente cuando se complementó la cepa mutante (Figura 5). Estos datos nos indicaron que el sistema de secreción de dos componentes AbFhaB/AbFhaC juega un papel en el mecanismo de interacción de la cepa de *A. baumannii* AbH120-A2 con la fibronectina de las células epiteliales.

El sistema de dos componentes AbFhaB/AbFhaC está implicado en virulencia en la cepa de A. baumannii AbH120-A2.

El papel del sistema de secreción de dos componentes AbFhaB/AbFhaC en la virulencia de la cepa de *A. baumannii* AbH120-A2 se evaluó mediante un ensayo de fertilidad usando un

modelo de *C. elegans* y mediante un ensayo de supervivencia utilizando un modelo de infección sistema en ratón.

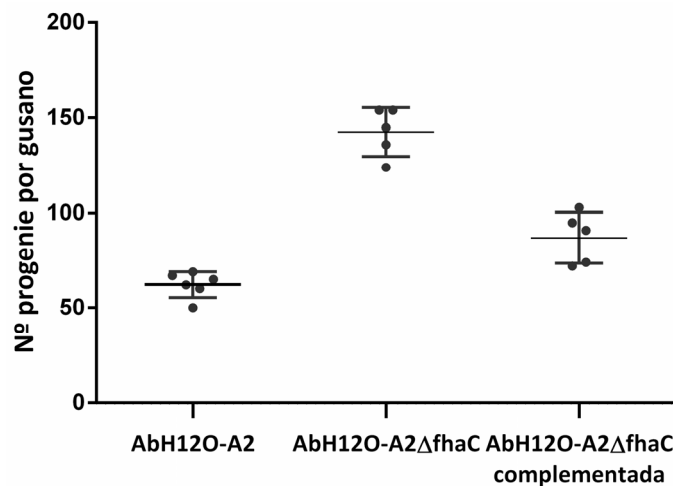


Figura 6. Experimento de fertilidad en *C. elegans*. El número de descendientes de un gusano en fase de crecimiento L4 se monitorizó durante 5 días en presencia de la cepa clínica de *A. baumannii* AbH12O-A2, su derivado isogénico mutante (AbH12O-A2ΔfhaC) y la correspondiente cepa complementada (AbH12O-A2ΔfhaC complementada). Seis réplicas independientes por experimento y los resultados fueron analizados con el test estadístico T-Student.

El modelo de invertebrado *C. elegans* mostró que cuando los gusanos fueron infectados con la cepa clínica AbH12O-A2 la descendencia se redujo significativamente a la mitad comparando con la cepa mutante isogénica AbH12O-A2ΔfhaC (Figura 6). La producción de prole fue dos veces superior cuando *C. elegans* se infectó con la cepa mutante deficiente en el gen *fhaC* con respecto a la cepa parental AbH12O-A2, siendo la diferencia en la prole estadísticamente significativa (P valor < 0,05). El fenotipo salvaje se restauró parcialmente cuando los gusanos fueron incubados con la cepa mutante isogénica complementada (AbH12O-A2ΔfhaC + pWH1266Tpm + FhaC).

También se evaluó la implicación en virulencia del sistema de secreción de dos componentes AbFhaB/AbFhaC mediante un modelo de infección sistémica de ratón. Los ratones BALB/c fueron infectados de forma intraperitoneal con la cepa clínica *A. baumannii* AbH12O-A2 y la cepa mutante isogénica AbH12O-A2ΔfhaC. Las tasas de supervivencia se controlaron durante varios días tal como se muestra en la Figura 7.

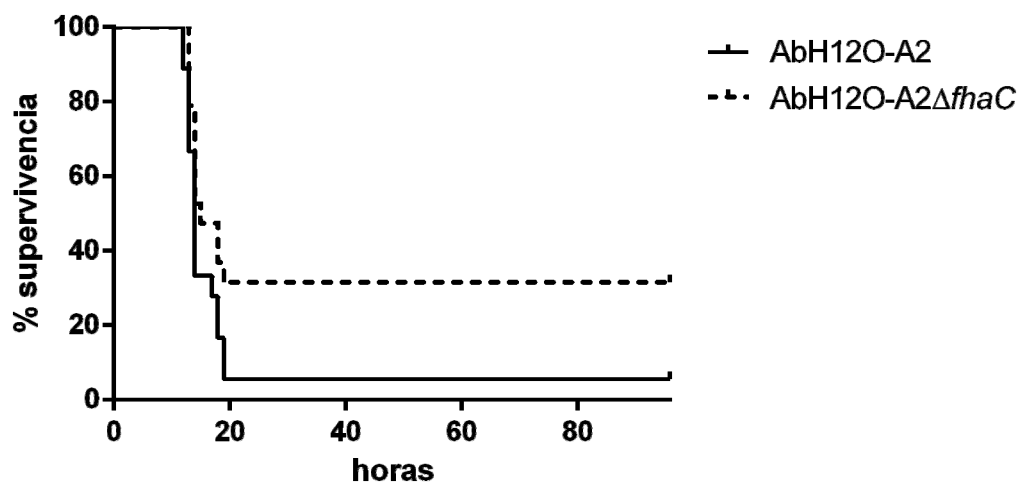


Figura 7. Curva de supervivencia de ratones BALB/c (n=18 por grupo) tras una infección intraperitoneal con inóculos de 34×10^7 UFC de la cepa clínica de *A. baumannii* AbH12O-A2 y 46×10^7 UFC de la cepa mutante isogénica de *A. baumannii* AbH12O-A2ΔfhaC. Los datos fueron analizados con el test estadístico Lon Rank.

Los resultados mostraron una mayor mortalidad (17 ratones de 18) asociada a la cepa clínica *A. baumannii* AbH12O-tras 20 h de infección (Figura 7). En contraste, los ratios de mortalidad se redujeron (12 ratones de 18) cuando los ratones fueron infectados con la cepa mutante en el mismo período de tiempo, *P* valor = 0,059.

4. DISCUSIÓN

4. Discusión

En los últimos años, han sido descritos múltiples brotes hospitalarios de *Acinetobacter baumannii* en diferentes hospitales de todo el mundo y el número de infecciones nosocomiales se ha incrementado sustancialmente (8, 51, 155, 156). En el presente trabajo, se estudió uno de los brotes hospitalarios más importantes *A. baumannii* conocidos hasta la fecha. Este brote tuvo lugar en el Hospital 12 de octubre de Madrid, entre los años 2006 y 2008 persistiendo durante 30 meses. Se han publicado muchos trabajos donde se describen serios brotes hospitalarios causados por una única cepa resistente a los carbapenemes (155, 157, 158). También se han descrito brotes hospitalarios producidos por distintas cepas resistentes a carbapenemes en períodos de tiempo consecutivos o solapados (159, 160), e incluso casos de diseminación clonal entre diferentes hospitales de ciudades o países diferentes (161). Hasta la fecha, el brote que aquí se estudia ostenta el título del brote de *A. baumannii* más importante que se ha producido en un solo hospital.

Así, en 2007 la incidencia de bacteriemias producidas por *A. baumannii* se incrementó de 0,03 a 1,1 episodios por 100.000 camas/día lo que originó el pico máximo del brote. El clon de *A. baumannii* AbH12O-A2 fue el responsable del 79,3 % de las bacteriemias producidas en el período 2006-2008. Aunque se produjeron casos de bacteriemia causados por otros clones de *A. baumannii* resistente a los carbapenemes antes de enero de 2006, todos estos clones fueron desplazados por la cepa *A. baumannii* AbH12O-A2. Esta cepa se estableció como endémica de ciertas áreas hospitalarias y su éxito se debió a su elevada capacidad de supervivencia y persistencia en el ambiente hospitalario. Como resultado de la alta incidencia de bacteriemias producidas por el clon AbH12O-A2 y, con el fin de determinar los factores de riesgo y características clínicas asociadas con este clon en particular, se realizó una comparación de las características clínicas de los pacientes que desarrollaron bacteriemias producidas por esta cepa con aquellas causadas por otros clones de *A. baumannii*. El análisis multivariante mostró que “estar hospitalizado en la UCI hospitalaria” o “haber estado expuesto previamente a 3 o más antibióticos” fueron factores de riesgo para desarrollar una bacteriemia causada por este clon AbH12O-A2. La combinación de “estar ingresado en la UCI”, lugar que está sometido a una alta presión antibiótica, junto con el fenotipo de multirresistencia que presentaba esta cepa AbH12O-A2, probablemente hayan contribuido su persistencia y a la aparición de nuevas infecciones en el torrente sanguíneo. Por otra parte, en cuanto al origen de las bacteriemias, las neumonías asociadas a ventilación mecánica pudieron

ser las promotoras de las bacteriemias secundarias, pasando así las bacterias desde los pulmones al torrente sanguíneo.

A lo largo del curso de este brote, de un total de 377 aislados, 290 se relacionaron con el clon AbH12O-A2. Esta cepa mostró unas características especiales desde el punto de vista microbiológico y molecular. Se trataba de una cepa multirresistente, sólo sensible a colistina y tigeciclina. Contenía el plásmido pMMA2 portador de un gen *bla*_{OXA-24} flanqueado por los sitios de recombinación XerC/XerD. Esta localización plasmídica facilitó la diseminación y transmisión horizontal de la β -lactamasa entre la cepa AbH12O-A2 y los otros clones del brote. Además, el estudio detallado de las secuencias codificantes del plásmido pMMA2 reveló la presencia de dos posibles factores de virulencia, los cuales resultaron estar sobreexpresados en el clon AbH12O-A2. Uno de ellos consistió en una toxina formadora de poros, una septicolisina. Este factor de virulencia se encontró sobreexpresado más de dos veces con respecto a lo encontrado en otros clones, debido a la inserción de una secuencia de la familia IS4, lo cual le confería una secuencia promotora más fuerte. Este gen mostró un nivel de expresión mucho menor cuando se encontró en otro clon esporádico del brote, el clon AbH12O-CU3, ya que carecía de esta secuencia de inserción del tipo IS4.

El papel exacto de la septicolisina aún no se ha determinado. El análisis de su secuencia mostró que presentaba homología con citolisinas dependientes de colesterol que ayudan a la bacteria en la invasión de tejidos y que han sido descritas en bacterias patógenas tales como *Clostridium perfringens*, *Bacillus anthracis* o *Streptococcus pneumoniae* (162). Los genes que codifican esta septicolisina han sido descritos en varios plásmidos de *A. baumannii* anteriormente (91, 163, 164). El hecho de que la septicolisina se encuentre tan extendida sugiere que este gen puede proporcionar ciertas ventajas a la bacteria portadora.

También se encontró que en el plásmido pMMA2 del clon AbH12O-A2 se sobreexpresaba un gen que codifica un receptor de membrana dependiente de TonB. Este tipo de proteínas participan en el proceso de adquisición de hierro produciendo energía para el transporte del complejo sideróforos-hierro al interior de la célula bacteriana. Por ello, estas proteínas están relacionadas con virulencia en *A. baumannii* a través de su papel en la adquisición de hierro (165) lo cual, a su vez, puede estar relacionado con la supervivencia de la bacteria en los pulmones o en la sangre del hospedador (139, 146, 166). El amplio espectro de resistencia a antibióticos junto con la sobreexpresión de estos dos factores de virulencia plasmídicos podría explicar la alta tasa de bacteriemias causadas por la cepa AbH12O-A2.

Los análisis comparativos de todas las secuencias de los plásmidos estudiados del brote demostraron que todos eran portadores de la carbapenemasa OXA-24 y, que en todos los casos, el gen *bla*_{OXA-24} estaba flanqueado por los sitios de recombinación XerC/XerD. El hecho de que el módulo de ADN formado por el gen *bla*_{OXA-24} flanqueado por las secuencias XerC/XerD se encuentre integrado en distintos plásmidos demuestra que durante el brote no hubo intercambio de un único plásmido portador del gen *bla*_{OXA-24} entre las diferentes cepas aisladas. La descripción de las estructuras de los plásmidos proporcionaron la evidencia de que se produjo un intercambio de una región de ADN portadora del gen *bla*_{OXA-24} flanqueada por los sitios de recombinación XerC/XerD entre los diversos plásmidos del brote. Además, cuando se comparó la región de ADN anterior y posterior al gen *bla*_{OXA-24} de los plásmidos aislados del brote con las secuencias de los plásmidos pABVA01, p2ABAYE, pAB0057, pAB02, pAB2, pAV1 o pABIR, se comprobó que el porcentaje de homología de las secuencias XerC/XerD era superior al 73 % en todos los casos. Estos datos indican que las regiones flanqueantes portadoras de los sitios XerC/XerD son de secuencias muy conservadas por lo que la recombinación Xer debe tratarse de un fenómeno que ha estado relacionado desde siempre con los genes tipo OXA-24. Grosso y col. (2012) estudiaron el entorno genético del gen *bla*_{OXA-24} en 15 cepas clínicas de *Acinetobacter* spp. confirmando lo anterior (83). D'Andrea y col. (2009) sugirieron por primera vez que estos sitios de recombinación XerC/XerD pueden actuar como dianas específicas de recombinación que permiten movilizar moléculas pequeñas de ADN entre plásmidos y cromosomas de *Acinetobacter* (82). Como los sitios de recombinación Xer están localizados en direcciones opuestas, la recombinación a través del sistema Xer debería suceder por una inversión en la posición de los genes.

La recombinación de ADN a través del sistema de recombinación Xer en plásmidos requiere de la participación de las recombinasas cromosómicas XerC y XerD, de los lugares de unión XerC/XerD, de la participación de las proteínas accesorias PepA, ArgR y ArcA y de una secuencia accesoria de aproximadamente 180 pares de bases localizada próxima al núcleo (167-170). La recombinación ocurre a través de la formación del complejo heterotetramérico en el cual cada recombinasa cataliza el intercambio de un par de hebras de ADN. Las proteínas accesorias se unirían a la secuencia e inducirían la formación de un complejo sináptico el cual es requerido para la recombinación (169). Estos eventos de recombinación se han relacionado con la integración sitio específico y escisión de los genomas lisogénicos, con la transposición de transposones conjugativos, con la terminación de la replicación cromosómica y con la estabilidad plasmídica en otras bacterias Gram-negativas (169, 171-173).

El análisis de las secuencias de los plásmidos reveló que todas las secuencias contenían el mismo *cassette de movilización* formado por una región de 142 pb seguida del sitio de recombinación XerC/XerD, una región de 72 pb previa al gen *bla*_{OXA-24}, tras el que se disponen 10 pb y el próximo sitio de recombinación XerD/XerC. En el presente trabajo se sugiere que estas dos regiones (de 142 y 72 bp) podrían actuar como dianas de unión de las proteínas accesorias requeridas para la recombinación Xer. Además, se han encontrado secuencias que codifican las recombinasas XerC y XerD en los genomas secuenciados de diferentes cepas de *A. baumannii*, tal es el caso de las cepas AB0057, SDF, AYE y ACICU. Los códigos de acceso del Genbank de la recombinasa XerC en dichos genomas son los siguientes: YP_002320364.1, YP_001706416.1, YP_001712817.1, y YP_001847531.1, respectivamente. Y para el caso de la recombinasa XerD: ZP_02977538.1, YP_001708368, YP_001715285.1, y YP_001844923.1, respectivamente. Además, en los genomas de *A. baumannii* AB0057, SDF, y AYE se ha encontrado la presencia de la proteína accesoria PepA (códigos de acceso del GenBank: YP_002317727.1, YP_001708379.1, y YP_001715297.1, respectivamente). En el genoma de la cepa clínica AbH12O-A2 los loci LX00_14100 y LX00_13000 codifican las recombinasas XerC y XerD, respectivamente. También se ha localizado el locus LX00_01240 que codifica una aminopeptidasa A (PepA).

Además, este sistema de recombinación XerC/XerD no es exclusivo de la β -lactamasa OXA-24. Povilonis y col. (2013) describieron un plásmido aislado de una cepa clínica que contenía dos copias de la β -lactamasa OXA-72 flanqueadas por los sitios de recombinación XerC/XerD y dispuestas en direcciones opuestas (84). Cayô y col. (2014) describieron la OXA-207, variante de la OXA-24 con un cambio aminoacídico, en una cepa de *Acinetobacter pittii*, la cual también estaba flanqueada por las secuencias de recombinación Xer. En este trabajo, los autores sugieren que se produjo un intercambio plasmídico entre una cepa de *A. baumannii* portadora de esta OXA-207 y la cepa de estudio *Acinetobacter pittii*, aunque, hasta la fecha, esta OXA-207 no ha sido descrita en ninguna cepa de *A. baumannii* (174).

El hecho de que la β -lactamasa OXA-24 constituya el mecanismo de resistencia a carbapenemes con mayor prevalencia en las cepas de *A. baumannii* multirresistentes en la península ibérica podría ser debido al exitoso mecanismo de diseminación a través del sistema de recombinación XerC/XerD junto con la presencia en sus plásmidos del sistema toxina/antitoxina descrito por Mosqueda y col, (2014). Este sistema se encontró en los plásmidos pMMA2 y pMMCU3 de las cepas brote. Se trataba de las ORFs 4 y 5 del plásmido

pMMA2, y de las ORFs 3 y 4 del plásmido pMMCU3. Este sistema les confiere una ventaja en la competición con otros plásmidos (175).

A. calcoaceticus ha sido considerado desde siempre un microorganismo ambiental, aislado del suelo o del agua. Sin embargo, últimamente se han publicado varios trabajos de cepas de *A. calcoaceticus* resistentes a antibióticos aisladas de muestras clínicas. En el presente trabajo se describe por primera vez una cepa de *A. calcoaceticus* portadora de un carbapenemasa OXA-24 aislada de una muestra de sangre. En el momento de la publicación del presente trabajo (152) sólo se conocía un trabajo previo donde se describían dos cepas de *A. calcoaceticus* que eran portadoras de una metalo- β -lactamasa IMP-4 localizada en un integrón de clase 1 (176). En la actualidad, existen ya varias publicaciones en las que se describen cepas de *A. calcoaceticus* resistentes a antibióticos. Sun y col. (2014) publicaron un trabajo donde se describía una cepa multirresistente de *A. calcoaceticus* portadora de la β -lactamasa NDM-1 plasmídica. Además, esta cepa también era portadora de una OXA-417 inactivada por la inserción de una *ISAb22*, y una cefalosporinasa ADC-72 (177). Perichón y col. (2014), realizaron un estudio con distintas cepas de *Acinetobacter* spp., entre las que se encontraban tres cepas de *A. calcoaceticus*. En estas cepas se encontraron tres β -lactamasas de clase D, OXA-213, OXA-268 y OXA-267, las cuales son intrínsecas de esta especie (178). Estas β -lactamasas de clase D ya fueron descritas en un estudio basado en la búsqueda de genes codificantes de oxacilinasas en distintas cepas de *Acinetobacter* spp (179).

En el presente trabajo se sugiere que la recombinación Xer podría actuar movilizand el gen *bla*_{OXA-24}. Por lo tanto, la explicación más probable indicaría que los eventos de recombinación mediados por Xer pudieron dirigir la diseminación del gen *bla*_{OXA-24} entre los diferentes plásmidos y la adquisición del gen *bla*_{OXA-24} por la cepa de *A. calcoaceticus*.

Desde que Smith y col (2007) publicaron la primera secuencia del genoma de *A. baumannii* ATCC 17978 (180), el número de genomas secuenciados se ha incrementado de manera exponencial. Incluso, se han creado revistas especializadas en la publicación de genomas. La gran demanda de secuenciación de bajo coste ha dado lugar a distintas tecnologías de secuenciación de alto rendimiento. Tres de las más utilizadas son: 454 de Roche, Solexa de Illumina y SOLID de Applied Biosystems. Hasta el momento se habían publicado trabajos de genomas de *A. baumannii* secuenciados utilizando 454 o Solexa (181-184). El genoma de la cepa clínica de *A. baumannii* AbH120-A2 fue secuenciado utilizando la plataforma Illumina.

El genoma completo de la cepa clínica AbH12O-A2 consistió en 3,87 MB y un contenido de G+C del 39,1 %. Estos datos coincidieron con otros genomas completos secuenciados de *A. baumannii*. El tamaño de los genomas de *A. baumannii* está comprendido entre 4,4 MB del genoma de la cepa de *A. baumannii* AB030 (código GenBank NZ_CP009257.1) y 3,48 MB del genoma de la cepa de *A. baumannii* SDF (código GenBank CU468230.2). Estas diferencias de tamaños, podrían ser debidas al estilo de vida de cada cepa. La cepa de *A. baumannii* SDF fue aislada de un piojo y era sensible a todos los antibióticos testados (92). En cambio, la cepa de *A. baumannii* AB030 fue aislada en una infección sanguínea y es extremadamente resistente a los antibióticos (sólo es sensible a colistina) (185). El contenido G+C está comprendido entre el 38,75 % del genoma de la cepa de *A. baumannii* 6411 (código GenBank NZ_CP010368.1) y el 39,34 % del genoma de la cepa de *A. baumannii* AYE (código GenBank NC_010410.1). El porcentaje de G+C es un dato característico de cada género que se utiliza para determinar material transferido de forma horizontal en un genoma.

Los análisis filogenéticos son útiles para estudiar la relación existente las cepas de *A. baumannii*. Las cepas de *A. baumannii* más próximas a la cepa clínica AbH12O-A2 están representadas en la Tabla 1, Anexo III. La cepa de *A. baumannii* ACICU es la cepa más próxima genéticamente al clon *A. baumannii* AbH12O-A2 (*score* 518), seguida la cepa *A. baumannii* AB900 (*score* 500) y de la cepa *A. baumannii* AYE (*score* 483). Estas tres cepas de *A. baumannii* son las cepas secuenciadas hasta el momento que mayor número de genes comparten con la cepa del brote AbH12O-A2. Además, las cepas de *A. baumannii* AYE, ACICU y AbH12O-A2 son cepas multirresistentes que han sido aisladas de brotes epidémicos en hospitales de Francia, Italia y España (151, 186, 187).

El genoma completo de la cepa clínica AbH12O-A2 está formado por 3.536 secuencias codificantes, 72 secuencias codificantes de ARN transferente y 6 clusters de ARN ribosómico. El número de *clusters* de ARNt en cepas de *Acinetobacter* puede variar entre 5 y 7 (91). La cepa de *A. baumannii* con menor número de secuencias codificantes descrita es ATCC 17978 (3367 secuencias codificantes) (180) y la cepa que más secuencias codificantes tiene es *A. baumannii* AB030, cepa con el genoma de mayor tamaño. La mayoría de las secuencias codificantes de la cepa *A. baumannii* AbH12O-A2 están relacionadas con procesos metabólicos y con funciones celulares generales tales como la división celular, el mantenimiento celular, el mantenimiento y la formación de la pared celular y la cápsula, el transporte a través de la membrana y la respuesta a estrés, entre otras. Un dato que llama la atención y que es común en todas las cepas de *Acinetobacter* es el elevado porcentaje de proteínas con función desconocida (138).

En el caso de *A. baumannii* AbH12O-A2, el 28 % de las secuencias codificantes del genoma se correspondieron con proteínas hipotéticas con función desconocida.

A raíz del aumento en la secuenciación de genomas, se han desarrollado múltiples herramientas que permiten la identificación de secuencias codificantes, regiones, o motivos concretos dentro de un genoma. Utilizando estos programas bioinformáticos, se observó que la cepa *A. baumannii* AbH12O-A2 tenía 56 secuencias codificantes relacionadas con resistencia a antibióticos y compuestos tóxicos. Los más abundantes son genes que codificaban bombas de expulsión, seguido de genes relacionados con la homeostasis y tolerancia al cobre, con la resistencia a cromo, cadmio, zinc y cobalto y, genes relacionados con la resistencia a arsénico. Además de la OXA-24 plasmídica descrita en el capítulo I, en el genoma de la cepa *A. baumannii* AbH12O-A2 se describieron genes de resistencia a aminoglucósidos (*aac(3)-IIa*, *strA*, y *strB*), genes de resistencia a antibióticos β -lactámicos (*bla*OXA-65, *bla*ADC-25, y *bla*_{TEM-1B}) y un gen de resistencia a sulfonamidas *Sul2*. La cepa de *A. baumannii* AbH12O-A2 no sólo es multiresistente a antibióticos, sino que también posee genes que le permiten sobrevivir en ambientes con altos niveles de metales pesados. Este hecho, le confiere la habilidad de persistir en ambientes hostiles muy diversos.

La presencia de bacteriófagos en los genomas bacterianos es un hecho bastante frecuente. Los fagos son parásitos naturales bacterianos y son muy específicos de su hospedador bacteriano. En los últimos años, el interés por estos microorganismos ha ido en aumento debido a que podrían utilizarse como agentes antibacterianos, que actuarían reduciendo la población bacteriana específica. El número de fagos descritos de *A. baumannii* es cada vez mayor (188-190). La cepa clínica *A. baumannii* AbH12O-A2, contiene cuatro fagos distribuidos en su genoma. Su distribución y organización en el genoma de la cepa AbH12O-A2 se representa en la, Figura 2A y B, Anexo III. El fago más grande (39,3 kb), completo, constó de 57 secuencias codificantes y presentó un alto grado de homología con el fago ya descrito *Acinetobacter phage* Bphi-B1251 (código GenBank NC_019541). Otro fago intacto, con un tamaño de 37 kb y compuesto por 32 secuencias codificantes, presentó un alto grado de homología con el fago *Enterobacteria phage* mEp235 (código GenBank NC_019708). En la actualidad, no hay ninguna publicación que haga referencia a estos fagos, por lo que sería interesante en un futuro comprobar su actividad lítica y si podrían utilizarse para tratar infecciones producidas por *A. baumannii* AbH12O-A2.

Las islas de resistencia son regiones específicas del genoma donde se acumulan secuencias de ADN adquiridas por transferencia horizontal y en las que se localizan genes de resistencia. La isla de resistencia más frecuentes en *A. baumannii* es *AbaR1*, la cual se encuentra insertada interrumpiendo la secuencia del gen *comM*. La cepa de *A. baumannii* AbH12O-A2 no presentó islas de resistencia del tipo *AbaR1*, aunque el gen *comM* se encontró íntegro (locus LX00_17140). En el genoma de esta cepa, se descubrió una región que no presenta homología con otras cepas estudiadas y que podría tratarse de una isla de resistencia. Su organización dentro del genoma de la cepa clínica AbH12O-A2 se encuentra en la Figura 1, Anexo III. Esta región estaba flanqueada por la secuencia *ISAbal* a ambos lados en direcciones opuestas. Dentro de esta región, que comprendía desde el locus LX00_17460 hasta el locus LX00_17595, destacaron 9 genes que codificaban transposasas, 4 genes de resistencia a antibióticos, un gen que codificaba una proteína de membrana relacionada con la resistencia a cloranfenicol y los genes *traA* y *traD*. Estos genes están relacionados con plásmidos conjugativos. En concreto, el gen *traA* codifica la relaxasa que facilita el proceso de conjugación de un plásmido (191). Estos datos, sugieren que un plásmido se integró en el genoma de la cepa *A. baumannii* AbH12O-A2 a través de la secuencia de inserción *ISAbal*. Este fenómeno de inserción de plásmidos en el cromosoma ha sido descrito en otras especies bacterianas (192). Recientemente, Garbari y col. (2015) describieron que el plásmido pKBU513, portador de una β -lactamasa KPC-2 se encontraba insertado interrumpiendo el locus codificante de una recombinasa Xer en el cromosoma de una cepa de *Klebsiella pneumoniae* (173).

El papel de *A. baumannii* como patógeno nosocomial oportunista ha sido muy estudiado, pero los aspectos moleculares de la patogénesis siguen siendo poco conocidos. La relevancia clínica de la bacteria *A. baumannii* está influenciada por su notable capacidad para adquirir mecanismos de resistencia. Además de este perfil de resistencia emergente, *A. baumannii* tiene la sorprendente capacidad de persistir durante períodos de tiempo prolongados en el ambiente hospitalario, lo que le confiere una ventaja para su diseminación nosocomial. La adherencia es el primer paso esencial para la colonización y el desarrollo de comunidades complejas y es un importante factor de virulencia extracelular, ya que facilita su persistencia en el huésped. Se han publicado trabajos previos con cepas clínicas de *A. baumannii* capaces de adherirse y formar biofilm (114, 193). Durante el capítulo IV de la presente tesis doctoral, mediante diferentes métodos fenotípicos y genotípicos, se han estado estudiado factores que podrían intervenir activamente en la persistencia y en el potencial infectivo de la cepa multirresistente de *A. baumannii* AbH12O-A2, cepa que causó un grave

brote nosocomial durante más de 30 meses y que dio cuenta de 65 casos de infecciones sanguíneas (151). Diversos experimentos fenotípicos realizados con la cepa *A. baumannii* AbH12O-A2 revelaron que esta cepa clínica tenía una capacidad extraordinaria para adherirse a distintos tipos de células epiteliales humanas, tales como las células alveolares A549 o las células HeLa. Sin embargo, esta cepa clínica de *A. baumannii* resultó ser una cepa inmóvil con una baja capacidad de formación de biofilm, incapaz de desarrollar un biofilm maduro sobre superficies abióticas, tal y como se ha visto mediante microscopía electrónica de barrido (Figura 1, Anexo IV). Estos resultados concuerdan con los datos obtenidos por Eijkelkamp y col. (2011) que, tras el análisis fenotípico de 52 aislamientos clínicos de *A. baumannii* (114), observaron que no existía una relación directa entre la capacidad de formación de biofilm, la adherencia y la movilidad de las diferentes cepas, sino que se trataba de mecanismos independientemente regulados. Diversos autores han sugerido que podrían existir diferentes mecanismos implicados en la adherencia a superficies bióticas y abióticas incluso dentro de una misma cepa (112, 114, 194).

Basándonos en estas observaciones, en la secuencia del genoma completo de la cepa de *A. baumannii* AbH12O-A2 (153) y en el análisis comparativo con otros genomas secuenciados de cepas de *A. baumannii* patógenas o comensales, pudimos identificar una región de 18 Kb que contenía un sistema de secreción de dos componentes (TPS), AbFhaB/AbFhaC, el cual resultó estar implicado en el fenotipo de adherencia y virulencia en esta cepa clínica. Los datos de nuestra secuencia mostraron que el operón AbFhaB/AbFhaC estaba localizado en una región de 18 Kb flanqueada por secuencias directas repetidas. Estas secuencias, normalmente comprendidas entre 16 y 20 pb, podrían actuar como sitios de reconocimiento de enzimas que participan en la escisión de elementos genéticos móviles. Este hecho, junto con el menor contenido en CG y la inserción junto a un gen codificante de ARNt, sugieren que esta secuencia pudo ser adquirida por transferencia genética horizontal como un elemento genético móvil para formar lo que se conoce como isla de patogenicidad (195, 196).

AbFhaB/AbFhaC es un sistema de secreción tipo V de dos componentes, conformado por dos proteínas: AbFhaB (proteína TpsA) y AbFhaC (proteína TpsB). El análisis de la secuencia N-terminal de la proteína AbFhaB reveló la presencia de un dominio TPS conservado en esta región. Este dominio TPS tiene un sitio de anclaje para su transportador (una secuencia de unión a TpsB), que sugiere que esta proteína TpsA es secretada y/o transportada por la proteína TpsB. El análisis de la secuencia aminoacídica mostró una elevada homología con otras proteínas tipo TpsA descritas, tales como la proteína Fha de *B. pertussis* (197) o la proteína

HecA de *Erwinia chrysanthem* (198). Además, esta proteína también contenía un motivo RGD el cual ha sido relacionado con adherencia a células de mamíferos a través de la unión a integrinas (199), aunque su papel en *A. baumannii* no ha sido demostrado. En contraste con la región N-terminal, la región del extremo C-terminal presentaba muy poca homología con la proteína Fha de *B. pertussis*. La proteína AbFhaC (proteína TpsB), proteína muy conservada en su totalidad que pertenece a la superfamilia de proteínas transportadoras Omp85/TPSB, media la secreción de la exoproteína AbFhaB al exterior. Las predicciones informáticas indicaron que la proteína AbFhaC constituye un canal transmembrana con forma de β -barril que hipotéticamente sirve como un conducto a través del cual la proteína AbFhaB sale al exterior. Esta proteína tiene un dominio polipeptídico asociado al transporte POTRA, el cual se cree que participa en el reconocimiento del dominio TPS de la proteína TpsA en el periplasma y la transloca a través de la membrana externa al exterior, donde permanecerá anclada en la membrana o será liberada al exterior (3, 197). Nuestros resultados mostraron que las células que producen el sistema AbFhaB/AbFhaC en la superficie bacteriana se adhieren significativamente en mayor porcentaje a las células epiteliales humanas que las células deficientes de AbFhaC. La inactivación funcional de este sistema de secreción de dos componentes fue abordada mediante el análisis del perfil proteico de las vesículas de membrana externa (OMVs) producidas tanto por la cepa clínica como por la cepa mutante derivada AbH12O-A2 Δ fhaC. Se confirmó que la proteína AbFhaB deja de ser secretada en ausencia de AbFhaC tal como ocurre en *B. pertussis* (200), ya que ambas proteínas funcionan como un operón. Las OMVs fueron utilizadas como material de partida para el análisis proteómico en lugar de las bacterias con el fin de eliminar un gran número de proteínas citoplasmáticas, ya que las proteínas de estudio estaban localizadas en la membrana externa. En las muestras de la cepa clínica AbH12O-A2, los péptidos de la proteína AbFhaB fueron identificados mediante ambas técnicas proteómicas. En cambio, los péptidos de la proteína AbFhaC sólo fueron identificados cuando se utilizó un método proteómico dirigido. Una explicación que podría darse en base a la composición de la proteína AbFhaC, guarda relación con la hidrofobicidad de sus péptidos, lo que dificultaría su identificación. En las muestras de la cepa *knockout* isogénica AbH12O-A2 Δ fhaC, ningún péptido de las proteínas AbFhaB y AbFhaC fue identificado, sugiriéndose que ambas funcionan como un operón.

Los sistemas de secreción de dos componentes juegan un papel muy importante en la adherencia a superficies bióticas (198, 201, 202).

En este trabajo hemos demostrado que cuando el sistema de secreción AbFhaB/AbFhaC de la cepa clínica AbH12O-A2 está funcionalmente inactivado, el fenotipo de adherencia mostrado por la cepa se ve significativamente reducido. Nuestros resultados están de acuerdo con los resultados obtenidos por Serra y col. (2011) y Darvish y col. (2014), donde se demuestra que estos sistemas de dos componentes desempeñan un papel clave en la adherencia a células epiteliales tanto en *B. pertussis* como en *A. baumannii* 19606^T (203, 204).

A diferencia de *A. baumannii* 19606^T, la ausencia del sistema de dos componentes AbFhaB/AbFhaC no tiene un claro efecto en la formación de biofilm según la evaluación por microscopía electrónica de barrido (datos no mostrados). Además, se ha descrito que la proteína Fha de *B. pertussis* contribuye a la maduración del biofilm promoviendo la formación de microcolonias (204). Sin embargo, este papel no se ha demostrado en *A. baumannii* AbH12O-A2 ya que esta cepa no es capaz de formar un biofilm maduro aunque muestra una gran habilidad para adherirse a superficies abióticas de acuerdo con los datos obtenidos por microscopía electrónica de barrido.

El análisis ultraestructural de las interacciones huésped-patógeno proporcionan conocimientos sobre los procesos celulares implicados en la patogénesis la cepa de *A. baumannii* AbH12O-A2. Esta cepa mostró no solo una notable capacidad para unirse a las células epiteliales, sino que además causó graves daños en la monocapa de células epiteliales alveolares humanas A549, implicando a la proteína AbFhaB expuesta en la superficie bacteriana. Las células A549 infectadas con la cepa mutante AbH12O-A2 Δ fhaC mostraron una significativa reducción del número de bacterias adheridas y la monocapa se encontraba significativamente más saludable que las infectadas con la cepa clínica parental.

Un análisis más detallado reveló que la proteína AbFhaB de la cepa clínica AbH12O-A2 interactúa con las células hospedadoras a través de la unión a la fibronectina. Las bacterias patógenas utilizan proteínas del tipo adhesinas para unirse de manera selectiva a proteínas de la matriz extracelular de las células epiteliales para posteriormente propagarse y diseminarse a otras partes del cuerpo. La fibronectina es una glicoproteína localizada en fluidos corporales, en las superficies celulares y en la matriz extracelular, cuya función consiste en conectar el citoesqueleto con la matriz extracelular donde están embebidas las células eucariotas (205). Se han publicado estudios que demuestran que la fibronectina celular humana actuaría como diana de adhesión para distintas especies bacterianas (206, 207). Smani y col. (2012) demostraron que *A. baumannii* tiene ligandos específicos para la proteína fibronectina

confirmando que la fibronectina es un potencial hospedador para *A. baumannii* (124). En el presente trabajo se demostró que la proteína AbFhaB actúa mediando la unión a la fibronectina inmovilizada en la cepa multirresistente de *A. baumannii* AbH12O-A2. La inactivación del sistema de dos componentes AbFhaB/AbFhaC redujo significativamente la adherencia a la fibronectina inmovilizada. Por lo tanto, queda demostrado que la proteína AbFhaB de la cepa clínica AbH12O-A2 localizada en la membrana externa, estaría implicada en la adherencia a células epiteliales humanas a través de su unión a la fibronectina celular humana.

Los aislados clínicos de *A. baumannii* causan sepsis aguda letal, neumonía, e infecciones de tejidos blandos cuando son probados empleando modelos de infección murina (208, 209). Dado que el sistema de dos componentes AbFhaB/AbFhaC desempeña un papel importante en la adherencia a tejidos epiteliales, quisimos evaluar su implicación en la virulencia de la cepa de *A. baumannii* AbH12O-A2. Para desarrollar estos experimentos, se llevaron a cabo dos modelos de infección animal que demostraron la importancia de este sistema de dos componentes en virulencia. Los experimentos de fertilidad realizados con el invertebrado *C. elegans* han sido previamente validados como un modelo sensible y reproducible para determinar diferencias sutiles entre cepas derivadas isogénicas de *A. baumannii* ATCC 17978 (120, 147). El gran número de huevos viables obtenidos cuando se incubaron los gusanos con la cepa mutante AbH12O-A2 Δ fhaC revelaron que la eliminación del gen *fhaC* causó un incremento significativo de la fertilidad de los gusanos, demostrando por tanto su implicación en la patogénesis de la cepa clínica de *A. baumannii* AbH12O-A2. Los resultados obtenidos usando el modelo de infección sistémica en ratón sugirieron que la habilidad de la cepa AbH12O-A2 para causar infección dependía parcialmente de la producción del sistema de dos componentes AbFhaB/AbFhaC.

5. CONCLUSIONES

5. Conclusiones

1. El brote nosocomial hospitalario que tuvo lugar en el Hospital 12 de Octubre de Madrid entre los años 2006-2008 fue producido por diferentes cepas de *Acinetobacter* resistentes a carbapenemes. El 73 % de los aislados obtenidos a partir de individuos colonizados/infectados se correspondieron con un pulsotipo mayoritario; la cepa *A. baumannii* AbH12O-A2.

2. La cepa *A. baumannii* AbH12O-A2 causó bacteriemias en el 22,5 % de los casos. Los factores de riesgo asociados a la adquisición de bacteriemias por *A. baumannii* AbH12O-A2 fueron la hospitalización en la UCI, la exposición previa a 3 o más antibióticos y la neumonía asociada a ventilación mecánica.

3. Durante el brote se estudiaron cinco cepas diferentes de *Acinetobacter* representados por los pulsotipos AbH12O-A2, AbH12O-D, AbH12O-CU1, AbH12O-CU2 y AbH12O-CU3. Todas las cepas del brote eran portadoras de un gen *bla*_{OXA-24}, flanqueado por los sitios de recombinación XerC/XerD, localizado en plásmidos diferentes (pMMA2, pMMD, pMMCU1, pMMCU2 y pMMCU3 con códigos de acceso al GenBank NC_013277.1, NC_019280.1, NC_013056.1, NC_013506.1 y NC_019199.1, respectivamente).

4. Se describió una β -lactamasa OXA-24 en la cepa de *Acinetobacter calcoaceticus* Acal H12O-07.

5. La cepa de *A. baumannii* AbH12O-A2 era portadora de dos factores de virulencia de localización plasmídica; un gen que codificaba una septicolisina, toxina formadora de poros, y un gen que codificaba una proteína dependiente de TonB, relacionada con el transporte del hierro. La inserción de una secuencia IS4 en la región promotora del gen de la septicolisina y el cambio de dos nucleótidos en la región promotora del gen dependiente de TonB, aportaron más fuerza a los promotores de ambos genes, por lo que la expresión de estos genes fue mayor en la cepa *A. baumannii* AbH12O-A2 que en los otros clones del brote. Este hecho supondría una ventaja para la cepa *A. baumannii* AbH12O-A2, lo cual le permitió instaurarse como cepa mayoritaria desplazando al resto de cepas del brote.

6. Se describió el genoma de la cepa *A. baumannii* AbH12O-A2 (GenBank C P009534). El genoma constaba de 3,87 MB y un contenido G + C del 39,4 %. El análisis genómico indicó que *A. baumannii* AbH12O-A2 es próxima filogenéticamente a la cepas de *A. baumannii* ACICU

y AYE, ambas cepas multirresistentes que también han sido aisladas durante brotes epidémicos.

7. La diseminación de la β -lactamasa OXA-24 a través de las distintas cepas de *Acinetobacter* del brote puede haber sido mediada por el sistema de recombinación Xer. Las secuencias que codifican las recombinasas Xer C y Xer D, así como la proteína accesoria PepA se localizaron en el genoma de la cepa *A. baumannii* AbH12O-A2.

8. La cepa de *A. baumannii* AbH12O-A2 presenta una alta capacidad de adhesión a células epiteliales humanas.

9. El sistema de secreción AbFhaB/AbFhaC descrito en la cepa de *A. baumannii* AbH12O-A2 está implicado en la adherencia a células epiteliales humanas. La proteína AbFhaB secretada a través de la proteína de membrana externa AbFhaC se adhiere a la fibronectina localizada en la matriz extracelular de las células epiteliales humanas.

10. El sistema de secreción AbFhaB/AbFhaC descrito en la cepa de *A. baumannii* AbH12O-A2 está implicado en virulencia tal como sugieren los modelos de infección realizados en *C. elegans* y en ratón.

11. El análisis proteómico de las vesículas de membrana externa, extraídas a partir de la cepa clínica *A. baumannii* AbH12O-A2 y de su derivado isogénico AbH12O-A2 Δ fhaC, mostró que estas dos proteínas sólo estaban presentes en la cepa salvaje. El sistema de secreción AbFhaB/AbFhaC funciona como un operón.

6. BIBLIOGRAFÍA

6. Bibliografía

1. Llarull LI, Testero SA, Fisher JF, Mobashery S. The future of the beta-lactams. *Curr Opin Microbiol.* 2010 Oct;13(5):551-7.
2. Furuya EY, Lowy FD. Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nat Rev Microbiol.* 2006 Jan;4(1):36-45.
3. Thanassi DG, Stathopoulos C, Karkal A, Li H. Protein secretion in the absence of ATP: the autotransporter, two-partner secretion and chaperone/usher pathways of gram-negative bacteria (review). *Mol Membr Biol.* 2005 Jan-Apr;22(1-2):63-72.
4. Visca P, Seifert H, Towner KJ. *Acinetobacter* infection--an emerging threat to human health. *IUBMB Life.* 2011 Dec;63(12):1048-54.
5. McConnell MJ, Actis L, Pachon J. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiol Rev.* 2013 Mar;37(2):130-55.
6. Evans BA, Amyes SG. OXA beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2014 Apr;27(2):241-63.
7. Torres C. La resistencia bacteriana a los antibióticos, siete décadas después de Fleming. Academia de Farmacia del Reino de Aragón [serial on the Internet]. 2012.
8. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 2008 Jul;21(3):538-82.
9. Barbe V, Vallenet D, Fonknechten N, Kreimeyer A, Oztas S, Labarre L, *et al.* Unique features revealed by the genome sequence of *Acinetobacter* sp. ADP1, a versatile and naturally transformation competent bacterium. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(19):5766-79.
10. Moreau NJ, Houot S, Joly-Guillou ML, Bergogne-Berezin E. Characterisation of DNA gyrase and measurement of drug accumulation in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* resistant to fluoroquinolones. *J Antimicrob Chemother.* 1996 Dec;38(6):1079-83.
11. Oren A, Garrity GM. Notification that new names of prokaryotes, new combinations and new taxonomic opinions have appeared in volume 65, part 4, of the IJSEM. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2015 Jul;65(7):2026-7.
12. Krizova L, McGinnis J, Maixnerova M, Nemecek M, Poirel L, Mingle L, *et al.* *Acinetobacter variabilis* sp. nov. (formerly DNA group 15 sensu Tjernberg & Ursing), isolated from humans and animals. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2015 Mar;65(Pt 3):857-63.
13. Chusri S, Chongsuivatwong V, Rivera JI, Silpapojakul K, Singkhamanan K, McNeil E, *et al.* Clinical outcomes of hospital-acquired infection with *Acinetobacter nosocomialis* and *Acinetobacter pittii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Jul;58(7):4172-9.

14. Nemeč A, Krizová L, Maixnerová M, van der Reijden TJ, Deschaght P, Passet V, *et al.* Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). *Res Microbiol.* 2011 May;162(4):393-404.
15. Lai CC, Hsu HL, Tan CK, Tsai HY, Cheng A, Liu CY, *et al.* Recurrent bacteremia caused by the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *J Clin Microbiol.* 2012 Sep;50(9):2982-6.
16. Wang X, Chen T, Yu R, Lu X, Zong Z. *Acinetobacter pittii* and *Acinetobacter nosocomialis* among clinical isolates of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*baumannii* complex in Sichuan, China. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013 Jul;76(3):392-5.
17. McGann P, Milillo M, Clifford RJ, Snesrud E, Stevenson L, Backlund MG, *et al.* Detection of New Delhi metallo-beta-lactamase (encoded by bla_{NDM-1}) in *Acinetobacter schindleri* during routine surveillance. *J Clin Microbiol.* 2013 Jun;51(6):1942-4.
18. Turton JF, Hyde R, Martin K, Shah J. Genes encoding OXA-134-like enzymes are found in *Acinetobacter lwoffii* and *A. schindleri* and can be used for identification. *J Clin Microbiol.* 2012 Mar;50(3):1019-22.
19. Endo S, Sasano M, Yano H, Inomata S, Ishibashi N, Aoyagi T, *et al.* IMP-1-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter ursingii* from Japan. *J Antimicrob Chemother.* 2012 Oct;67(10):2533-4.
20. Loubinoux J, Mihaila-Amrouche L, Le Fleche A, Pigne E, Huchon G, Grimont PA, *et al.* Bacteremia caused by *Acinetobacter ursingii*. *J Clin Microbiol.* 2003 Mar;41(3):1337-8.
21. Seifert H, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Pelzer N, Tjernberg I, Vaneechoutte M. Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *J Clin Microbiol.* 1997 Nov;35(11):2819-25.
22. Baumann P. Isolation of *Acinetobacter* from soil and water. *J Bacteriol.* 1968 Jul;96(1):39-42.
23. Choi JY, Ko G, Jheong W, Huys G, Seifert H, Dijkshoorn L, *et al.* *Acinetobacter kookii* sp. nov., isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013 Dec;63(Pt 12):4402-6.
24. Krizová L, Maixnerová M, Sedo O, Nemeč A. *Acinetobacter bohemicus* sp. nov. widespread in natural soil and water ecosystems in the Czech Republic. *Syst Appl Microbiol.* 2014 Oct;37(7):467-73.
25. Li W, Zhang D, Huang X, Qin W. *Acinetobacter harbinensis* sp. nov., isolated from river water. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2014 May;64(Pt 5):1507-13.

26. Talbot GH, Bradley J, Edwards JE, Jr., Gilbert D, Scheld M, Bartlett JG. Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2006 Mar 1;42(5):657-68.
27. Towner KJ. *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. *J Hosp Infect*. 2009 Dec;73(4):355-63.
28. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol*. 2007 Dec;5(12):939-51.
29. Antunes LC, Visca P, Towner KJ. *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. *Pathog Dis*. 2014 Aug;71(3):292-301.
30. Garnacho J, Sole-Violan J, Sa-Borges M, Diaz E, Rello J. Clinical impact of pneumonia caused by *Acinetobacter baumannii* in intubated patients: a matched cohort study. *Crit Care Med*. 2003 Oct;31(10):2478-82.
31. Bouvet PJ, Grimont PA. Identification and biotyping of clinical isolates of *Acinetobacter*. *Ann Inst Pasteur Microbiol*. 1987 Sep-Oct;138(5):569-78.
32. Bou G, Cervero G, Dominguez MA, Quereda C, Martinez-Beltran J. PCR-based DNA fingerprinting (REP-PCR, AP-PCR) and pulsed-field gel electrophoresis characterization of a nosocomial outbreak caused by imipenem- and meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect*. 2000 Dec;6(12):635-43.
33. Ahmed SS, Alp E. Genotyping methods for monitoring the epidemic evolution of *A. baumannii* strains. *J Infect Dev Ctries*. 2015 Apr;9(4):347-54.
34. Espinal P, Seifert H, Dijkshoorn L, Vila J, Roca I. Rapid and accurate identification of genomic species from the *Acinetobacter baumannii* (Ab) group by MALDI-TOF MS. *Clin Microbiol Infect*. 2012 Nov;18(11):1097-103.
35. Bou G, Fernández-Olmos A, García C, Sáez-Nieto JA, Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29(8):601-8.
36. Zarrilli R, Pournaras S, Giannouli M, Tsakris A. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. *Int J Antimicrob Agents*. 2013 Jan;41(1):11-9.
37. Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol*. 2010 Jun;8(6):423-35.
38. Suarez C, Gudiol F. [Beta-lactam antibiotics]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009 Feb;27(2):116-29.
39. Zapun A, Contreras-Martel C, Vernet T. Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2008 Mar;32(2):361-85.

40. Wilke MS, Lovering AL, Strynadka NC. Beta-lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Curr Opin Microbiol*. 2005 Oct;8(5):525-33.
41. Fernandez-Cuenca F, Martinez-Martinez L, Conejo MC, Ayala JA, Perea EJ, Pascual A. Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*. 2003 Mar;51(3):565-74.
42. Cayo R, Rodriguez MC, Espinal P, Fernandez-Cuenca F, Ocampo-Sosa AA, Pascual A, *et al*. Analysis of genes encoding penicillin-binding proteins in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Dec;55(12):5907-13.
43. Vila J, Marti S, Sanchez-Cespedes J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*. 2007 Jun;59(6):1210-5.
44. Limansky AS, Mussi MA, Viale AM. Loss of a 29-kilodalton outer membrane protein in *Acinetobacter baumannii* is associated with imipenem resistance. *J Clin Microbiol*. 2002 Dec;40(12):4776-8.
45. del Mar Tomas M, Beceiro A, Perez A, Velasco D, Moure R, Villanueva R, *et al*. Cloning and functional analysis of the gene encoding the 33- to 36-kilodalton outer membrane protein associated with carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Dec;49(12):5172-5.
46. Coyne S, Courvalin P, Perichon B. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Mar;55(3):947-53.
47. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1980 May 16;289(1036):321-31.
48. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Mar;54(3):969-76.
49. Potron A, Poirel L, Nordmann P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. *Int J Antimicrob Agents*. 2015 Jun;45(6):568-85.
50. Martinez T, Vazquez GJ, Aquino EE, Martinez I, Robledo IE. ISEcp1-mediated transposition of *bla*_{KPC} into the chromosome of a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* from Puerto Rico. *J Med Microbiol*. 2014 Dec;63(Pt 12):1644-8.
51. Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Oct;51(10):3471-84.

52. Cornaglia G, Akova M, Amicosante G, Canton R, Cauda R, Docquier JD, *et al.* Metallo-beta-lactamases as emerging resistance determinants in Gram-negative pathogens: open issues. *Int J Antimicrob Agents*. 2007 Apr;29(4):380-8.
53. Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. Metallo-beta-lactamases: a last frontier for beta-lactams? *Lancet Infect Dis*. 2011 May;11(5):381-93.
54. Bonnin RA, Nordmann P, Poirel L. Screening and deciphering antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii*: a state of the art. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2013 Jun;11(6):571-83.
55. Bonnin RA, Poirel L, Naas T, Pirs M, Seme K, Schrenzel J, *et al.* Dissemination of New Delhi metallo-beta-lactamase-1-producing *Acinetobacter baumannii* in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2012 Sep;18(9):E362-5.
56. Bonnin RA, Poirel L, Nordmann P. New Delhi metallo-beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii*: a novel paradigm for spreading antibiotic resistance genes. *Future Microbiol*. 2014;9(1):33-41.
57. Kaase M, Nordmann P, Wichelhaus TA, Gatermann SG, Bonnin RA, Poirel L. NDM-2 carbapenemase in *Acinetobacter baumannii* from Egypt. *J Antimicrob Chemother*. 2011 Jun;66(6):1260-2.
58. Rodriguez-Martinez JM, Nordmann P, Ronco E, Poirel L. Extended-spectrum cephalosporinase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Aug;54(8):3484-8.
59. Hall LM, Livermore DM, Gur D, Akova M, Akalin HE. OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993 Aug;37(8):1637-44.
60. Aubert D, Poirel L, Ali AB, Goldstein FW, Nordmann P. OXA-35 is an OXA-10-related beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*. 2001 Nov;48(5):717-21.
61. Vila J, Navia M, Ruiz J, Casals C. Cloning and nucleotide sequence analysis of a gene encoding an OXA-derived beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997 Dec;41(12):2757-9.
62. Paton R, Miles RS, Hood J, Amyes SG. ARI 1: beta-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents*. 1993 Feb;2(2):81-7.
63. Espinal P, Macia MD, Roca I, Gato E, Ruiz E, Fernandez-Cuenca F, *et al.* First report of an OXA-23 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* clinical isolate related to Tn2006 in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Jan;57(1):589-91.

64. Merino M, Poza M, Roca I, Barba MJ, Sousa MD, Vila J, *et al.* Nosocomial outbreak of a multiresistant *Acinetobacter baumannii* expressing OXA-23 carbapenemase in Spain. *Microb Drug Resist.* 2014 Aug;20(4):259-63.
65. Mugnier PD, Poirel L, Naas T, Nordmann P. Worldwide dissemination of the *bla*_{OXA-23} carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis.* 2010 Jan;16(1):35-40.
66. Bou G, Oliver A, Martinez-Beltran J. OXA-24, a novel class D beta-lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000 Jun;44(6):1556-61.
67. Santillana E, Beceiro A, Bou G, Romero A. Crystal structure of the carbapenemase OXA-24 reveals insights into the mechanism of carbapenem hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Mar 27;104(13):5354-9.
68. Bou G, Santillana E, Sheri A, Beceiro A, Sampson JM, Kalp M, *et al.* Design, synthesis, and crystal structures of 6-alkylidene-2'-substituted penicillanic acid sulfones as potent inhibitors of *Acinetobacter baumannii* OXA-24 carbapenemase. *J Am Chem Soc.* 2010 Sep 29;132(38):13320-31.
69. Brown S, Young HK, Amyes SG. Characterisation of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina. *Clin Microbiol Infect.* 2005 Jan;11(1):15-23.
70. Turton JF, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Pike R, Livermore DM, *et al.* The role of ISAbal in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol Lett.* 2006 May;258(1):72-7.
71. Poirel L, Marque S, Heritier C, Segonds C, Chabanon G, Nordmann P. OXA-58, a novel class D {beta}-lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Jan;49(1):202-8.
72. Higgins PG, Schneiders T, Hamprecht A, Seifert H. In vivo selection of a missense mutation in *adeR* and conversion of the novel *bla*_{OXA-164} gene into *bla*_{OXA-58} in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from a hospitalized patient. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Dec;54(12):5021-7.
73. Poirel L, Mansour W, Bouallegue O, Nordmann P. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Tunisia producing the OXA-58-like carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-97. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 May;52(5):1613-7.
74. Higgins PG, Zander E, Seifert H. Identification of a novel insertion sequence element associated with carbapenem resistance and the development of fluoroquinolone resistance in *Acinetobacter radioresistens*. *J Antimicrob Chemother.* 2013 Mar;68(3):720-2.

75. Figueiredo S, Poirel L, Seifert H, Mugnier P, Benhamou D, Nordmann P. OXA-134, a naturally occurring carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase from *Acinetobacter lwoffii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Dec;54(12):5372-5.
76. Higgins PG, Perez-Llarena FJ, Zander E, Fernandez A, Bou G, Seifert H. OXA-235, a novel class D beta-lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 May;57(5):2121-6.
77. Siguier P, Perochon J, Lestrade L, Mahillon J, Chandler M. ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Res*. 2006 Jan 1;34(Database issue):D32-6.
78. Corvec S, Caroff N, Espaze E, Giraudeau C, Drugeon H, Reynaud A. AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains. *J Antimicrob Chemother*. 2003 Oct;52(4):629-35.
79. Mugnier PD, Poirel L, Nordmann P. Functional analysis of insertion sequence ISAba1, responsible for genomic plasticity of *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol*. 2009 Apr;191(7):2414-8.
80. Tsakris A, Ikonomidis A, Poulou A, Spanakis N, Vrizas D, Diomidous M, *et al*. Clusters of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clones producing different carbapenemases in an intensive care unit. *Clin Microbiol Infect*. 2008 Jun;14(6):588-94.
81. Toleman MA, Bennett PM, Walsh TR. ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? *Microbiol Mol Biol Rev*. 2006 Jun;70(2):296-316.
82. D'Andrea MM, Giani T, D'Arezzo S, Capone A, Petrosillo N, Visca P, *et al*. Characterization of pABVA01, a plasmid encoding the OXA-24 carbapenemase from Italian isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Aug;53(8):3528-33.
83. Grosso F, Quinteira S, Poirel L, Novais A, Peixe L. Role of common *bla*_{OXA-24/OXA-40}-carrying platforms and plasmids in the spread of OXA-24/OXA-40 among *Acinetobacter* species clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Jul;56(7):3969-72.
84. Povilonis J, Seputiene V, Krasauskas R, Juskaite R, Miskinyte M, Suziedelis K, *et al*. Spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying a plasmid with two genes encoding OXA-72 carbapenemase in Lithuanian hospitals. *J Antimicrob Chemother*. 2013 May;68(5):1000-6.
85. Ploy MC, Lambert T, Couty JP, Denis F. Integrons: an antibiotic resistance gene capture and expression system. *Clin Chem Lab Med*. 2000 Jun;38(6):483-7.
86. Rowe-Magnus DA, Mazel D. Resistance gene capture. *Curr Opin Microbiol*. 1999 Oct;2(5):483-8.

87. Ramirez MS, Pineiro S, Centron D. Novel insights about class 2 integrons from experimental and genomic epidemiology. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Feb;54(2):699-706.
88. Bertini A, Poirel L, Mugnier PD, Villa L, Nordmann P, Carattoli A. Characterization and PCR-based replicon typing of resistance plasmids in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Oct;54(10):4168-77.
89. Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Genetic features of the widespread plasmid coding for the carbapenemase OXA-48. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Jan;56(1):559-62.
90. 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.
91. Vallenet D, Nordmann P, Barbe V, Poirel L, Mangenot S, Bataille E, *et al.* Comparative analysis of *Acinetobacters*: three genomes for three lifestyles. *PLoS One.* 2008;3(3):e1805.
92. Fournier PE, Vallenet D, Barbe V, Audic S, Ogata H, Poirel L, *et al.* Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Genet.* 2006 Jan;2(1):e7.
93. Babic A, Lindner AB, Vulic M, Stewart EJ, Radman M. Direct visualization of horizontal gene transfer. *Science.* 2008 Mar 14;319(5869):1533-6.
94. Perez-Cruz C, Delgado L, Lopez-Iglesias C, Mercade E. Outer-inner membrane vesicles naturally secreted by gram-negative pathogenic bacteria. *PLoS One.* 2015;10(1):e0116896.
95. Chattopadhyay MK, Jaganandham MV. Vesicles-mediated resistance to antibiotics in bacteria. *Front Microbiol.* 2015;6:758.
96. Yaron S, Kolling GL, Simon L, Matthews KR. Vesicle-mediated transfer of virulence genes from *Escherichia coli* O157:H7 to other enteric bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 2000 Oct;66(10):4414-20.
97. Klieve AV, Yokoyama MT, Forster RJ, Ouwerkerk D, Bain PA, Mawhinney EL. Naturally occurring DNA transfer system associated with membrane vesicles in cellulolytic *Ruminococcus* spp. of ruminal origin. *Appl Environ Microbiol.* 2005 Aug;71(8):4248-53.
98. Chopade BA, Wise PJ, Towner KJ. Plasmid transfer and behaviour in *Acinetobacter calcoaceticus* EBF65/65. *J Gen Microbiol.* 1985 Oct;131(10):2805-11.
99. Herman NJ, Juni E. Isolation and characterization of a generalized transducing bacteriophage for *Acinetobacter*. *J Virol.* 1974 Jan;13(1):46-52.
100. Juni E. Interspecies transformation of *Acinetobacter*: genetic evidence for a ubiquitous genus. *J Bacteriol.* 1972 Nov;112(2):917-31.
101. Rumbo C, Fernandez-Moreira E, Merino M, Poza M, Mendez JA, Soares NC, *et al.* Horizontal transfer of the OXA-24 carbapenemase gene via outer membrane vesicles: a new

- mechanism of dissemination of carbapenem resistance genes in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2011 Jul;55(7):3084-90.
102. Beceiro A, Tomas M, Bou G. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? Clin Microbiol Rev. 2013 Apr;26(2):185-230.
103. Cerqueira GM, Peleg AY. Insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenicity. IUBMB Life. 2011 Dec;63(12):1055-60.
104. Eijkelkamp BA, Stroehler UH, Hassan KA, Paulsen IT, Brown MH. Comparative analysis of surface-exposed virulence factors of *Acinetobacter baumannii*. BMC Genomics. 2014;15:1020.
105. Gaddy JA, Tomaras AP, Actis LA. The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells. Infect Immun. 2009 Aug;77(8):3150-60.
106. Leo JC, Grin I, Linke D. Type V secretion: mechanism(s) of autotransport through the bacterial outer membrane. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2012 Apr 19;367(1592):1088-101.
107. Gawarzewski I, Smits SH, Schmitt L, Jose J. Structural comparison of the transport units of type V secretion systems. Biol Chem. 2013 Nov;394(11):1385-98.
108. Bentancor LV, Camacho-Peiro A, Bozkurt-Guzel C, Pier GB, Maira-Litran T. Identification of Ata, a multifunctional trimeric autotransporter of *Acinetobacter baumannii*. J Bacteriol. 2012 Aug;194(15):3950-60.
109. Bentancor LV, Routray A, Bozkurt-Guzel C, Camacho-Peiro A, Pier GB, Maira-Litran T. Evaluation of the trimeric autotransporter Ata as a vaccine candidate against *Acinetobacter baumannii* infections. Infect Immun. 2012 Oct;80(10):3381-8.
110. Rumbo-Feal S, Gomez MJ, Gayoso C, Alvarez-Fraga L, Cabral MP, Aransay AM, et al. Whole transcriptome analysis of *Acinetobacter baumannii* assessed by RNA-sequencing reveals different mRNA expression profiles in biofilm compared to planktonic cells. PLoS One. 2013;8(8):e72968.
111. Tomaras AP, Dorsey CW, Edelmann RE, Actis LA. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. Microbiology. 2003 Dec;149(Pt 12):3473-84.
112. de Breij A, Gaddy J, van der Meer J, Koning R, Koster A, van den Broek P, et al. CsuA/BABCDE-dependent pili are not involved in the adherence of *Acinetobacter baumannii* ATCC19606(T) to human airway epithelial cells and their inflammatory response. Res Microbiol. 2009 Apr;160(3):213-8.

113. Loehfelm TW, Luke NR, Campagnari AA. Identification and characterization of an *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein. *J Bacteriol.* 2008 Feb;190(3):1036-44.
114. Eijkelkamp BA, Stroehler UH, Hassan KA, Papadimitriou MS, Paulsen IT, Brown MH. Adherence and motility characteristics of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. *FEMS Microbiol Lett.* 2011 Oct;323(1):44-51.
115. Clemmer KM, Bonomo RA, Rather PN. Genetic analysis of surface motility in *Acinetobacter baumannii*. *Microbiology.* 2011 Sep;157(Pt 9):2534-44.
116. Henrichsen J, Blom J. Correlation between twitching motility and possession of polar fimbriae in *Acinetobacter calcoaceticus*. *Acta Pathol Microbiol Scand B.* 1975 Apr;83(2):103-15.
117. Mussi MA, Gaddy JA, Cabruja M, Arivett BA, Viale AM, Rasia R, *et al.* The opportunistic human pathogen *Acinetobacter baumannii* senses and responds to light. *J Bacteriol.* 2010 Dec;192(24):6336-45.
118. Luke NR, Sauberan SL, Russo TA, Beanan JM, Olson R, Loehfelm TW, *et al.* Identification and characterization of a glycosyltransferase involved in *Acinetobacter baumannii* lipopolysaccharide core biosynthesis. *Infect Immun.* 2010 May;78(5):2017-23.
119. Knapp S, Florquin S, Golenbock DT, van der Poll T. Pulmonary lipopolysaccharide (LPS)-binding protein inhibits the LPS-induced lung inflammation in vivo. *J Immunol.* 2006 Mar 1;176(5):3189-95.
120. Beceiro A, Moreno A, Fernandez N, Vallejo JA, Aranda J, Adler B, *et al.* Biological cost of different mechanisms of colistin resistance and their impact on virulence in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(1):518-26.
121. Russo TA, Luke NR, Beanan JM, Olson R, Sauberan SL, MacDonald U, *et al.* The K1 capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* strain 307-0294 is a major virulence factor. *Infect Immun.* 2010 Sep;78(9):3993-4000.
122. 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 Feb;10(2):309-19.
123. Jin JS, Kwon SO, Moon DC, Gurung M, Lee JH, Kim SI, *et al.* *Acinetobacter baumannii* secretes cytotoxic outer membrane protein A via outer membrane vesicles. *PLoS One.* 2011;6(2):e17027.
124. Smani Y, McConnell MJ, Pachon J. Role of fibronectin in the adhesion of *Acinetobacter baumannii* to host cells. *PLoS One.* 2012;7(4):e33073.
125. Fernandez-Cuenca F, Smani Y, Gomez-Sanchez MC, Docobo-Perez F, Caballero-Moyano FJ, Dominguez-Herrera J, *et al.* Attenuated virulence of a slow-growing pandrug-resistant

- Acinetobacter baumannii* is associated with decreased expression of genes encoding the porins CarO and OprD-like. *Int J Antimicrob Agents*. 2011 Dec;38(6):548-9.
126. Rumbo C, Tomas M, Fernandez Moreira E, Soares NC, Carvajal M, Santillana E, *et al*. The *Acinetobacter baumannii* Omp33-36 porin is a virulence factor that induces apoptosis and modulates autophagy in human cells. *Infect Immun*. 2014 Nov;82(11):4666-80.
127. Smani Y, Dominguez-Herrera J, Pachon J. Association of the outer membrane protein Omp33 with fitness and virulence of *Acinetobacter baumannii*. *J Infect Dis*. 2013 Nov 15;208(10):1561-70.
128. Jun SH, Lee JH, Kim BR, Kim SI, Park TI, Lee JC, *et al*. *Acinetobacter baumannii* outer membrane vesicles elicit a potent innate immune response via membrane proteins. *PLoS One*. 2013;8(8):e71751.
129. Mendez JA, Soares NC, Mateos J, Gayoso C, Rumbo C, Aranda J, *et al*. Extracellular proteome of a highly invasive multidrug-resistant clinical strain of *Acinetobacter baumannii*. *J Proteome Res*. 2012 Dec 7;11(12):5678-94.
130. Antunes LC, Imperi F, Carattoli A, Visca P. Deciphering the multifactorial nature of *Acinetobacter baumannii* pathogenicity. *PLoS One*. 2011;6(8):e22674.
131. Camarena L, Bruno V, Euskirchen G, Poggio S, Snyder M. Molecular mechanisms of ethanol-induced pathogenesis revealed by RNA-sequencing. *PLoS Pathog*. 2010 Apr;6(4):e1000834.
132. Russo TA, MacDonald U, Beanan JM, Olson R, MacDonald IJ, Sauberan SL, *et al*. Penicillin-binding protein 7/8 contributes to the survival of *Acinetobacter baumannii* in vitro and in vivo. *J Infect Dis*. 2009 Feb 15;199(4):513-21.
133. Antunes LC, Imperi F, Towner KJ, Visca P. Genome-assisted identification of putative iron-utilization genes in *Acinetobacter baumannii* and their distribution among a genotypically diverse collection of clinical isolates. *Res Microbiol*. 2011 Apr;162(3):279-84.
134. Yamamoto S, Okujo N, Sakakibara Y. Isolation and structure elucidation of acinetobactin, a novel siderophore from *Acinetobacter baumannii*. *Arch Microbiol*. 1994;162(4):249-54.
135. Mihara K, Tanabe T, Yamakawa Y, Funahashi T, Nakao H, Narimatsu S, *et al*. Identification and transcriptional organization of a gene cluster involved in biosynthesis and transport of acinetobactin, a siderophore produced by *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606T. *Microbiology*. 2004 Aug;150(Pt 8):2587-97.
136. Hasan T, Choi CH, Oh MH. Genes Involved in the Biosynthesis and Transport of Acinetobactin in *Acinetobacter baumannii*. *Genomics Inform*. 2015 Mar;13(1):2-6.

137. Gaddy JA, Arivett BA, McConnell MJ, Lopez-Rojas R, Pachon J, Actis LA. Role of acinetobactin-mediated iron acquisition functions in the interaction of *Acinetobacter baumannii* strain ATCC 19606T with human lung epithelial cells, *Galleria mellonella* caterpillars, and mice. *Infect Immun*. 2012 Mar;80(3):1015-24.
138. Imperi F, Antunes LC, Blom J, Villa L, Iacono M, Visca P, *et al*. The genomics of *Acinetobacter baumannii*: insights into genome plasticity, antimicrobial resistance and pathogenicity. *IUBMB Life*. 2011 Dec;63(12):1068-74.
139. Dorsey CW, Tomaras AP, Connerly PL, Tolmasky ME, Crosa JH, Actis LA. The siderophore-mediated iron acquisition systems of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 and *Vibrio anguillarum* 775 are structurally and functionally related. *Microbiology*. 2004 Nov;150(Pt 11):3657-67.
140. Jacobs AC, Hood I, Boyd KL, Olson PD, Morrison JM, Carson S, *et al*. Inactivation of phospholipase D diminishes *Acinetobacter baumannii* pathogenesis. *Infect Immun*. 2010 May;78(5):1952-62.
141. Nowak J, Seifert H, Higgins P. The tellurite-resistance determinant Tpm of the *Acinetobacter baylyi* strain ADP1 as a useful non-antibiotic selection marker for genetic manipulation in *Acinetobacter baumannii*. In: ESMIC, editor. 23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases; 28 April 2013; Berlin, German2013.
142. Amin IM, Richmond GE, Sen P, Koh TH, Piddock LJ, Chua KL. A method for generating marker-less gene deletions in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *BMC Microbiol*. 2013;13:158.
143. Rappsilber J, Mann M, Ishihama Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat Protoc*. 2007;2(8):1896-906.
144. Mateos J, Pintor-Iglesias A, Fernandez-Puente P, Garcia-Camba M, Ruiz-Romero C, Domenech N, *et al*. Cryoconservation of peptide extracts from trypsin digestion of proteins for proteomic analysis in a hospital biobank facility. *J Proteome Res*. 2014 Apr 4;13(4):1930-7.
145. Penwell WF, Arivett BA, Actis LA. The *Acinetobacter baumannii* entA gene located outside the acinetobactin cluster is critical for siderophore production, iron acquisition and virulence. *PLoS One*. 2012;7(5):e36493.
146. Zimble DL, Arivett BA, Beckett AC, Menke SM, Actis LA. Functional features of TonB energy transduction systems of *Acinetobacter baumannii*. *Infect Immun*. 2013 Sep;81(9):3382-94.

147. Vallejo JA, Beceiro A, Rumbo-Feal S, Rodriguez-Palero MJ, Russo TA, Bou G. Optimisation of the *Caenorhabditis elegans* model for studying the pathogenesis of opportunistic *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents*. 2015 Jul 9.
148. Darling AC, Mau B, Blattner FR, Perna NT. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Res*. 2004 Jul;14(7):1394-403.
149. Jones P, Binns D, Chang HY, Fraser M, Li W, McAnulla C, et al. InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*. 2014 May 1;30(9):1236-40.
150. Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJ. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc*. 2015 Jun;10(6):845-58.
151. Acosta J, Merino M, Viedma E, Poza M, Sanz F, Otero JR, et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* Harboring OXA-24 carbapenemase, Spain. *Emerg Infect Dis*. 2011 Jun;17(6):1064-7.
152. Merino M, Acosta J, Poza M, Sanz F, Beceiro A, Chaves F, et al. OXA-24 carbapenemase gene flanked by XerC/XerD-like recombination sites in different plasmids from different *Acinetobacter* species isolated during a nosocomial outbreak. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Jun;54(6):2724-7.
153. Merino M, Alvarez-Fraga L, Gomez MJ, Aransay AM, Lavin JL, Chaves F, et al. Complete Genome Sequence of the Multiresistant *Acinetobacter baumannii* Strain AbH120-A2, Isolated during a Large Outbreak in Spain. *Genome Announc*. 2014;2(6).
154. Gayoso CM, Mateos J, Mendez JA, Fernandez-Puente P, Rumbo C, Tomas M, et al. Molecular mechanisms involved in the response to desiccation stress and persistence in *Acinetobacter baumannii*. *J Proteome Res*. 2014 Feb 7;13(2):460-76.
155. del Mar Tomas M, Cartelle M, Pertega S, Beceiro A, Llinares P, Canle D, et al. Hospital outbreak caused by a carbapenem-resistant strain of *Acinetobacter baumannii*: patient prognosis and risk-factors for colonisation and infection. *Clin Microbiol Infect*. 2005 Jul;11(7):540-6.
156. Dettori M, Piana A, Deriu MG, Lo Curto P, Cossu A, Musumeci R, et al. Outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit. *New Microbiol*. 2014 Apr;37(2):185-91.
157. Wareham DW, Bean DC, Khanna P, Hennessy EM, Krahe D, Ely A, et al. Bloodstream infection due to *Acinetobacter* spp: epidemiology, risk factors and impact of multi-drug resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2008 Jul;27(7):607-12.

158. Lee NY, Lee HC, Ko NY, Chang CM, Shih HI, Wu CJ, *et al.* Clinical and economic impact of multidrug resistance in nosocomial *Acinetobacter baumannii* bacteremia. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2007 Jun;28(6):713-9.
159. Corbella X, Montero A, Pujol M, Dominguez MA, Ayats J, Argerich MJ, *et al.* Emergence and rapid spread of carbapenem resistance during a large and sustained hospital outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol.* 2000 Nov;38(11):4086-95.
160. Shelburne SA, 3rd, Singh KV, White AC, Jr., Byrne L, Carmer A, Austin C, *et al.* Sequential outbreaks of infections by distinct *Acinetobacter baumannii* strains in a public teaching hospital in Houston, Texas. *J Clin Microbiol.* 2008 Jan;46(1):198-205.
161. Manikal VM, Landman D, Saurina G, Oydna E, Lal H, Quale J. Endemic carbapenem-resistant *Acinetobacter* species in Brooklyn, New York: citywide prevalence, interinstitutional spread, and relation to antibiotic usage. *Clin Infect Dis.* 2000 Jul;31(1):101-6.
162. Rosado CJ, Kondos S, Bull TE, Kuiper MJ, Law RH, Buckle AM, *et al.* The MACPF/CDC family of pore-forming toxins. *Cell Microbiol.* 2008 Sep;10(9):1765-74.
163. Adams MD, Goglin K, Molyneaux N, Hujer KM, Lavender H, Jamison JJ, *et al.* Comparative genome sequence analysis of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol.* 2008 Dec;190(24):8053-64.
164. Zarrilli R, Vitale D, Di Popolo A, Bagattini M, Daoud Z, Khan AU, *et al.* A plasmid-borne blaOXA-58 gene confers imipenem resistance to *Acinetobacter baumannii* isolates from a Lebanese hospital. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Nov;52(11):4115-20.
165. Dorsey CW, Tolmasky ME, Crosa JH, Actis LA. Genetic organization of an *Acinetobacter baumannii* chromosomal region harbouring genes related to siderophore biosynthesis and transport. *Microbiology.* 2003 May;149(Pt 5):1227-38.
166. Reeves SA, Torres AG, Payne SM. TonB is required for intracellular growth and virulence of *Shigella dysenteriae*. *Infect Immun.* 2000 Nov;68(11):6329-36.
167. Summers DK, Sherratt DJ. Multimerization of high copy number plasmids causes instability: ColE1 encodes a determinant essential for plasmid monomerization and stability. *Cell.* 1984 Apr;36(4):1097-103.
168. Tolmasky ME, Colloms S, Blakely G, Sherratt DJ. Stability by multimer resolution of pJHCMW1 is due to the Tn1331 resolvase and not to the *Escherichia coli* Xer system. *Microbiology.* 2000 Mar;146 (Pt 3):581-9.
169. Bui D, Ramiscal J, Trigueros S, Newmark JS, Do A, Sherratt DJ, *et al.* Differences in resolution of mwr-containing plasmid dimers mediated by the *Klebsiella pneumoniae* and

Escherichia coli XerC recombinases: potential implications in dissemination of antibiotic resistance genes. J Bacteriol. 2006 Apr;188(8):2812-20.

170. Cornet F, Mortier I, Patte J, Louarn JM. Plasmid pSC101 harbors a recombination site, psi, which is able to resolve plasmid multimers and to substitute for the analogous chromosomal *Escherichia coli* site dif. J Bacteriol. 1994 Jun;176(11):3188-95.

171. Val ME, Bouvier M, Campos J, Sherratt D, Cornet F, Mazel D, *et al.* The single-stranded genome of phage CTX is the form used for integration into the genome of *Vibrio cholerae*. Mol Cell. 2005 Aug 19;19(4):559-66.

172. Summers DK, Sherratt DJ. Resolution of ColE1 dimers requires a DNA sequence implicated in the three-dimensional organization of the cer site. EMBO J. 1988 Mar;7(3):851-8.

173. Garbari L, Busetti M, Dolzani L, Petix V, Knezevich A, Bressan R, *et al.* pKBU513, a KPC-2-Encoding Plasmid from *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 833, Carrying Tn4401b Inserted into an Xer Site-Specific Recombination Locus. Antimicrob Agents Chemother. 2015 Sep;59(9):5226-31.

174. Cayo R, Merino M, Ruiz Del Castillo B, Cano ME, Calvo J, Bou G, *et al.* OXA-207, a novel OXA-24 variant with reduced catalytic efficiency against carbapenems in *Acinetobacter pittii* from Spain. Antimicrob Agents Chemother. 2014 Aug;58(8):4944-8.

175. Mosqueda N, Gato E, Roca I, Lopez M, de Alegria CR, Fernandez Cuenca F, *et al.* Characterization of plasmids carrying the *bla*_{OXA-24/40} carbapenemase gene and the genes encoding the AbkA/AbkB proteins of a toxin/antitoxin system. J Antimicrob Chemother. 2014 Oct;69(10):2629-33.

176. Hwa WE, Subramaniam G, Navaratnam P, Sekaran SD. Detection and characterization of class 1 integrons among carbapenem-resistant isolates of *Acinetobacter* spp. in Malaysia. J Microbiol Immunol Infect. 2009 Feb;42(1):54-62.

177. Sun Y, Liu Q, Chen S, Song Y, Liu J, Guo X, *et al.* Characterization and plasmid elimination of NDM-1-producing *Acinetobacter calcoaceticus* from China. PLoS One. 2014;9(9):e106555.

178. Perichon B, Goussard S, Walewski V, Krizova L, Cerqueira G, Murphy C, *et al.* Identification of 50 class D beta-lactamases and 65 *Acinetobacter*-derived cephalosporinases in *Acinetobacter* spp. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58(2):936-49.

179. Figueiredo S, Bonnin RA, Poirel L, Duranteau J, Nordmann P. Identification of the naturally occurring genes encoding carbapenem-hydrolysing oxacillinases from *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter johnsonii*, and *Acinetobacter calcoaceticus*. Clin Microbiol Infect. 2012 Sep;18(9):907-13.

180. Smith MG, Gianoulis TA, Pukatzki S, Mekalanos JJ, Ornston LN, Gerstein M, *et al.* New insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis. *Genes Dev.* 2007 Mar 1;21(5):601-14.
181. Alvarez-Fraga L, Lopez M, Merino M, Rumbo-Feal S, Tomas M, Bou G, *et al.* Draft Genome Sequence of the Biofilm-Hyperproducing *Acinetobacter baumannii* Clinical Strain MAR002. *Genome Announc.* 2015;3(4).
182. Davenport KW, Daligault HE, Minogue TD, Bruce DC, Chain PS, Coyne SR, *et al.* Draft Genome Assembly of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606. *Genome Announc.* 2014;2(4).
183. Opazo A, Lopes BS, Garcia P, Dominguez Yevenes M, Lima C, Bello-Toledo H, *et al.* Draft Genome Sequence of a Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Strain from Chile. *Genome Announc.* 2015;3(4).
184. Traglia GM, Almuzara M, Barberis C, Montana S, Schramm ST, Enriquez B, *et al.* Draft genome sequence of a taxonomically unique acinetobacter clinical strain with proteolytic and hemolytic activities. *Genome Announc.* 2015;3(2).
185. Loewen PC, Alsaadi Y, Fernando D, Kumar A. Genome Sequence of an Extremely Drug-Resistant Clinical Isolate of *Acinetobacter baumannii* Strain AB030. *Genome Announc.* 2014;2(5).
186. Iacono M, Villa L, Fortini D, Bordoni R, Imperi F, Bonnal RJ, *et al.* Whole-genome pyrosequencing of an epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain belonging to the European clone II group. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Jul;52(7):2616-25.
187. Heritier C, Poirel L, Fournier PE, Claverie JM, Raoult D, Nordmann P. Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Oct;49(10):4174-9.
188. Chen LK, Liu YL, Hu A, Chang KC, Lin NT, Lai MJ, *et al.* Potential of bacteriophage PhiAB2 as an environmental biocontrol agent for the control of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *BMC Microbiol.* 2013;13:154.
189. Kim JH, Oh C, Choresca CH, Shin SP, Han JE, Jun JW, *et al.* Complete genome sequence of bacteriophage phiAC-1 infecting *Acinetobacter soli* strain KZ-1. *J Virol.* 2012 Dec;86(23):13131-2.
190. Merabishvili M, Vandenheuvel D, Kropinski AM, Mast J, De Vos D, Verbeken G, *et al.* Characterization of newly isolated lytic bacteriophages active against *Acinetobacter baumannii*. *PLoS One.* 2014;9(8):e104853.

191. Yang JC, Lessard PA, Sengupta N, Windsor SD, O'Brien X M, Bramucci M, *et al.* TraA is required for megaplasmid conjugation in *Rhodococcus erythropolis* AN12. *Plasmid*. 2007 Jan;57(1):55-70.
192. Zhu L, Yan Z, Zhang Z, Zhou Q, Zhou J, Wakeland EK, *et al.* Complete genome analysis of three *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in China for insight into the diversification of drug resistance elements. *PLoS One*. 2013;8(6):e66584.
193. Lee JC, Koerten H, van den Broek P, Beekhuizen H, Wolterbeek R, van den Barselaar M, *et al.* Adherence of *Acinetobacter baumannii* strains to human bronchial epithelial cells. *Res Microbiol*. 2006 May;157(4):360-6.
194. Lee HW, Koh YM, Kim J, Lee JC, Lee YC, Seol SY, *et al.* Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. *Clin Microbiol Infect*. 2008 Jan;14(1):49-54.
195. Hayek N. Lateral transfer and GC content of bacterial resistant genes. *Front Microbiol*. 2013;4:41.
196. Gal-Mor O, Finlay BB. Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. *Cell Microbiol*. 2006 Nov;8(11):1707-19.
197. Clantin B, Hodak H, Willery E, Locht C, Jacob-Dubuisson F, Villeret V. The crystal structure of filamentous hemagglutinin secretion domain and its implications for the two-partner secretion pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Apr 20;101(16):6194-9.
198. Rojas CM, Ham JH, Deng WL, Doyle JJ, Collmer A. HecA, a member of a class of adhesins produced by diverse pathogenic bacteria, contributes to the attachment, aggregation, epidermal cell killing, and virulence phenotypes of *Erwinia chrysanthemi* EC16 on *Nicotiana glauca* seedlings. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Oct 1;99(20):13142-7.
199. D'Souza SE, Ginsberg MH, Burke TA, Lam SC, Plow EF. Localization of an Arg-Gly-Asp recognition site within an integrin adhesion receptor. *Science*. 1988 Oct 7;242(4875):91-3.
200. Jacob-Dubuisson F, Locht C, Antoine R. Two-partner secretion in Gram-negative bacteria: a thrifty, specific pathway for large virulence proteins. *Mol Microbiol*. 2001 Apr;40(2):306-13.
201. Tala A, Progida C, De Stefano M, Cogli L, Spinosa MR, Bucci C, *et al.* The HrpB-HrpA two-partner secretion system is essential for intracellular survival of *Neisseria meningitidis*. *Cell Microbiol*. 2008 Dec;10(12):2461-82.
202. Di Venanzio G, Stepanenko TM, Garcia Vescovi E. *Serratia marcescens* ShIA pore-forming toxin is responsible for early induction of autophagy in host cells and is transcriptionally regulated by RcsB. *Infect Immun*. 2014 Sep;82(9):3542-54.

203. Darvish Alipour Astaneh S, Rasooli I, Mousavi Gargari SL. The role of filamentous hemagglutinin adhesin in adherence and biofilm formation in *Acinetobacter baumannii* ATCC19606(T). *Microb Pathog*. 2014 Sep;74:42-9.
204. Serra DO, Conover MS, Arnal L, Sloan GP, Rodriguez ME, Yantorno OM, *et al*. FHA-mediated cell-substrate and cell-cell adhesions are critical for *Bordetella pertussis* biofilm formation on abiotic surfaces and in the mouse nose and the trachea. *PLoS One*. 2011;6(12):e28811.
205. Henderson B, Nair S, Pallas J, Williams MA. Fibronectin: a multidomain host adhesin targeted by bacterial fibronectin-binding proteins. *FEMS Microbiol Rev*. 2011 Jan;35(1):147-200.
206. van der Flier M, Chhun N, Wizemann TM, Min J, McCarthy JB, Tuomanen EI. Adherence of *Streptococcus pneumoniae* to immobilized fibronectin. *Infect Immun*. 1995 Nov;63(11):4317-22.
207. Tsang TM, Felek S, Krukoni ES. Ail binding to fibronectin facilitates *Yersinia pestis* binding to host cells and Yop delivery. *Infect Immun*. 2010 Aug;78(8):3358-68.
208. Russo TA, Beanan JM, Olson R, MacDonald U, Luke NR, Gill SR, *et al*. Rat pneumonia and soft-tissue infection models for the study of *Acinetobacter baumannii* biology. *Infect Immun*. 2008 Aug;76(8):3577-86.
209. McConnell MJ, Dominguez-Herrera J, Smani Y, Lopez-Rojas R, Docobo-Perez F, Pachon J. Vaccination with outer membrane complexes elicits rapid protective immunity to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Infect Immun*. 2011 Jan;79(1):518-26.

7. ANEXO

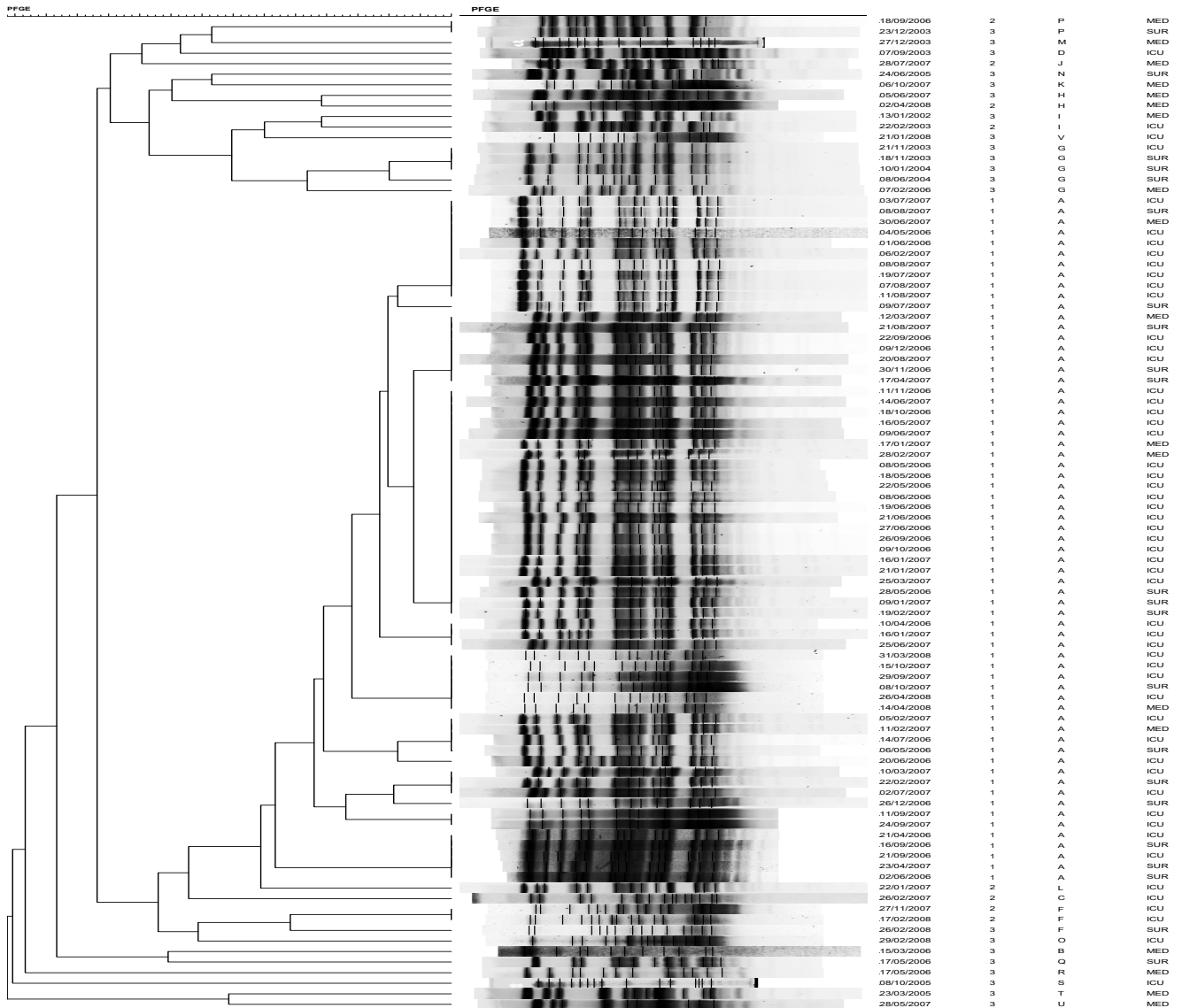
7.1. ANEXO I

Tabla 1. Perfiles de sensibilidad antibiótica de la clínica de *A. baumannii* AbH12O-A2, de la cepa sensible a antibióticos *A. baylyi* ADP1 y de la cepa de *A. baylyi* transformada con el plásmido pMMA2 aislado de la cepa clínica. Experimentos realizados por microdilución en LB.

Antibiótico	CMI (mg/L) de <i>Acinetobacter</i> sp		
	<i>A. baumannii</i> AbH12O-A2 portador del plásmido pMMA2	<i>A. baylyi</i> ADP1 portador del plásmido pMMA2	<i>A. baylyi</i> ADP1
Ampicilina	>256	>256	4
Piperacilina	>256	>256	16
Cefalotina	>256	24	12
Cefuroxima	>256	12	4
cefotaxima	>256	4	4
Ceftazidima	32	4	4
Cefepime	16	2	1
Imipenem	>32	>32	0.094
Meropenem	>32	>32	0.125
Ciprofloxacino	>2	- ^a	-
Sulfametoxazol	>4/76	-	-
Amikacina	>32	-	-
Rifampicina	4	-	-
Tigeciclina	2	-	-
Colistina	1	-	-

a. CMI no realizada.

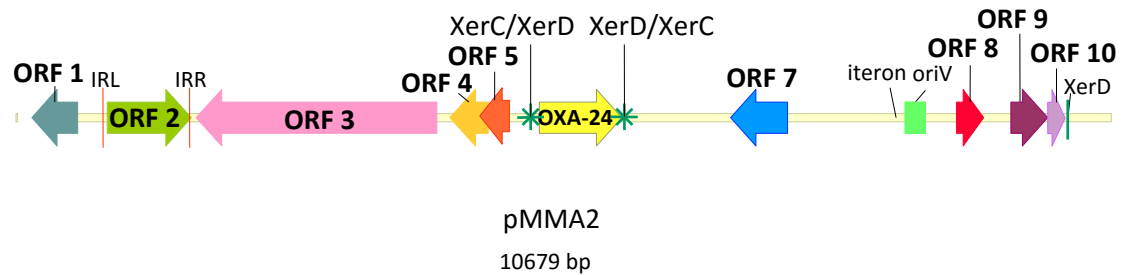
Figura 1. Patrones de electroforesis de campo pulsado de 94 cepas causantes de bacteriemias aisladas entre Enero de 2002 y Mayo de 2008. Las columnas de la derecha indican: datos de aislamiento, antibiotipo, patrón de campo pulsado y área clínica de procedencia de estas cepas clínicas.



7.2. ANEXO II

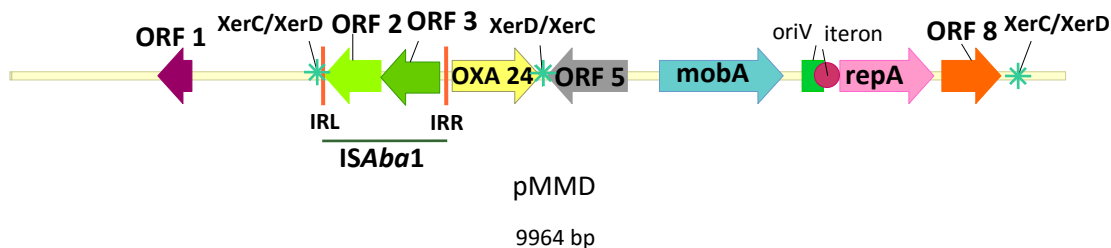
Figura 1. Secuencia y organización de los plásmidos secuenciados del brote. Figuras realizadas con el programa informático Vector NTi.

A) Secuencia y organización del plásmido pMMA2 aislado a partir de la cepa clínica de *A. baumannii* AbH120-A2 (Código acceso GenBank NC_013277.1).



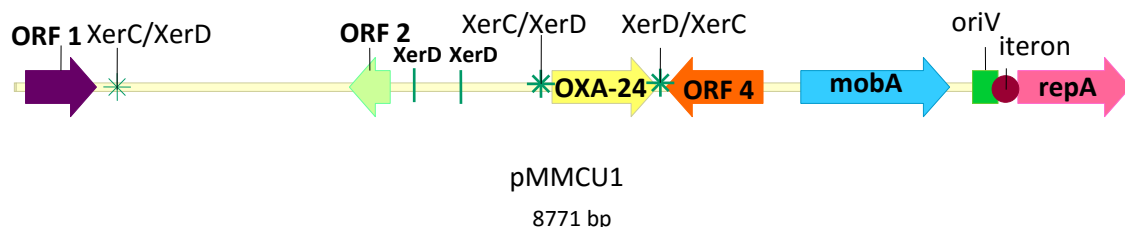
Caracter	Posición	Propiedades y/o supuesta función	Homología (código GenBank/EMBL)
ORF1	141-602	Septicolisina (endotoxina)	p2ABAYE (CU459138.1)
IRL	897-1739		
ORF2	1418-1719	Probable secuencia de inserción tipo IS4	YP_001957893.1
IRR	1722-1739		
ORF3	1793-4204	Receptor dependiente de TonB	
ORF4	4332-4715	Posible proteínas citoplasmática	p2ABAYE (CU459138.1)
ORF5	4633-4929	Posible proteína de membrana interna	
XerC/XerD	5128-5155	Sitio de recombinación	
<i>bla</i> _{OXA24}	5229-6056	Carbapenemasa OXA-24	AJ239129
XerD/XerC	6069-6096	Sitio de recombinación	pABVA01 (FM210331.1)
ORF6	7145-7714	Proteína de replicación del ADN	ZP_04663577
iteron	8791-8878	4 repeticiones imperfectas iterónicas; control de la replicación del ADN	
oriV	8896-9100	Origen de replicación	p2ABAYE (CU459138.1)
ORF 7	9410-9682	Proteína hipotética	
ORF 8	9953-10324	Proteína hipotética	
ORF9	10324-10497	Proteína hipotética	
XerD	10521-10531	Sitio de recombinación	pABVA01 (FM210331.1)

B) Secuencia y organización del plásmido pMMD aislado a partir de la cepa clínica de *A. baumannii* AbH12O-D (Código acceso GenBank NC_019280.1).



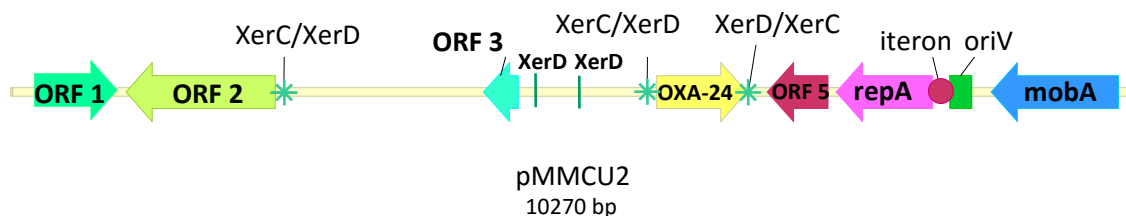
Caracter	Posición	Propiedades y/o supuesta función	Homología (código GenBank/EMBL)
ORF1	1383-1703	Proteína hipotética	YP_001708460
XerC/XerD	2877-2904	Sitio de recombinación	pABVA01 (FM210331.1)
IRL	2938-2953		
ORF2	2956-3492	Trasposasa 2	YP_001712181
ORF3	3489-4046	Trasposasa 1	
IRR	4102-4117		
<i>bla</i> _{OXA24}	4167-4994	Carbapenemasa OXA-24	AJ239129
XerD/XerC	5005-5031	Sitio de recombinación	pABVA01 (FM210331.1)
ORF5	5063-5821	Proteína hipotética	pMAC (AY541809)
mobA	6125-7294	Protein de movilización del ADN	
oriV	7475-7675	Origen de replicación del ADN	
Iteron	7692-7787	4 repeticiones imperfectas iterónicas; control de la replicación del ADN	pAB02 (AY228470)
repA	7832-8719	Proteína replicación de ADN	
ORF8	8796-9353	Proteína hipotética	
XerC/XerD	9504-9531	Sitio de recombinación	pABVA01 (FM210331.1)

C) Secuencia y organización del plásmido pMMCU1 aislado a partir de la cepa clínica de *A. baumannii* AbH12O-CU1 (Código acceso GenBank NC_013056.1).



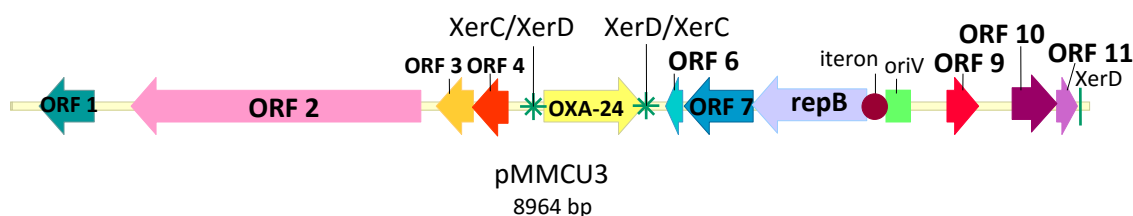
Caracter	Posición	Propiedades y/o supuesta función	Homología (código GenBank/EMBL)
ORF 1	74-631	Proteína desconocida	pAB02 (AY228470)
XerC/XerD	782-809	Sitio de recombinación	pABVA01 (FM210331.1)
ORF2	2621-2941		ABSDF (CU468230)
XerD	3090-3100	Sitio de recombinación	pABVA01 (FM210331.1)
XerD	3503-3513	Sitio de recombinación	pABVA01 (FM210331.1)
XerC/XerD	4116-4143	Sitio de recombinación	pABVA01 (FM210331.1)
<i>bla</i> _{OXA24}	4217-5044	Carbapenemasa OXA-24	AJ239129
XerD/XerC	5055-5082	Sitio de recombinación	pABVA01 (FM210331.1)
ORF3	5113-5874	Proteína hipotética	pMAC (AY541809)
mobA	6174-7343	Proteína movilización del plásmido	pMAC (AY541809)
OriV	7523-7723	Origen de replicación del ADN	pAB02 (AY228470)
Iteron	7740-7835	4 repeticiones imperfectas iterónicas; control de la replicación del ADN	pAB02 (AY228470)
repA	7880-8767	Proteína replicación de ADN	pAB02 (AY228470)

D) Secuencia y organización del plásmido pMMCU2 aislado a partir de la cepa clínica de *A. baumannii* AbH12O-CU2 (Código acceso GenBank NC_013506.1).



Caracter	Posición	Propiedades y/o supuesta función	Homología (código GenBank/EMBL)
ORF1	200-961	Proteína hipotética	pMAC (AY541809)
ORF2	1041-2414	Transposasa	ZP_03823714.1
XerC/XerD	2480-2507	Sitio de recombinación	pABVA01 (FM210331.1)
ORF3	4329-4649	Proteína hipotética	YP_001708460.1
XerD	4799-4809	Sitio de recombinación	
XerD	5209-5219	Sitio de recombinación	pABVA01 (FM210331.1)
XerC/XerD	5822-5849	Sitio de recombinación	
<i>bla</i> _{OXA24}	5923-6750	Carbapenemasa OXA-24	AJ239129
XerD/XerC		Sitio de recombinación	pABVA01 (FM210331.1)
ORF5	6939-7496	Proteína hipotética	
repA	7573-8460	Proteína replicación de ADN	
Iteron	8505-8600	4 repeticiones imperfectas iterónicas; control de la replicación del ADN	pAB02 (AY228470)
OriV	8617-8817	Origen de replicación del ADN	
mobA	8998-10167	Proteína movilización del plásmido	pMAC (AY541809)

E) Secuencia y organización del plásmido pMMCU3 aislado a partir de la cepa clínica de *A. baumannii* AbH12O-CU3 (Código acceso GenBank NC_019199.1):



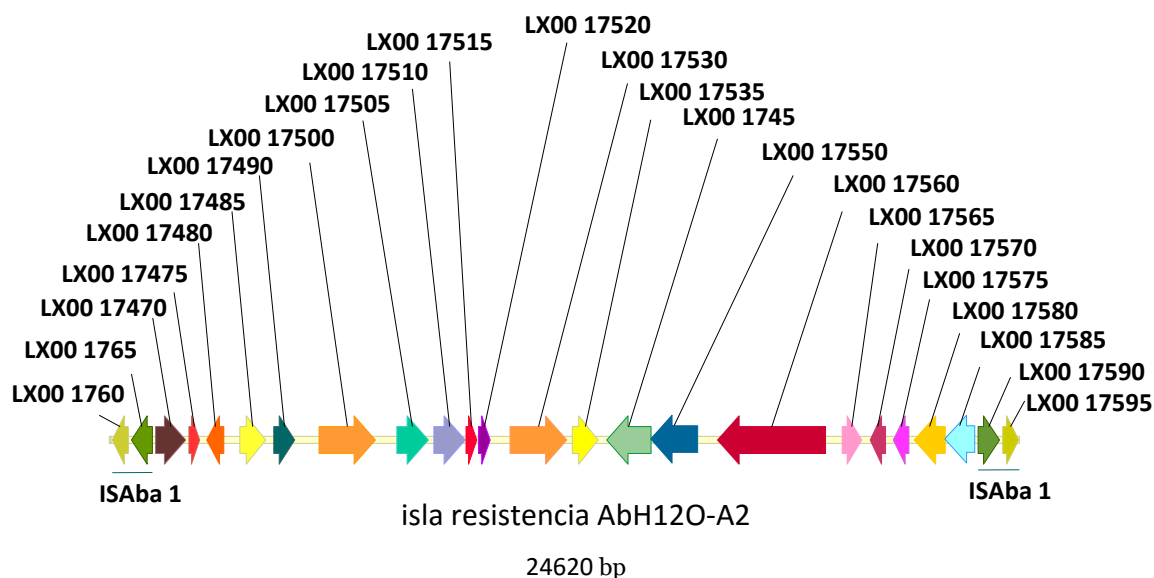
Caracter	Posición	Propiedades y/o supuesta función	Homología (código GenBank/EMBL)
ORF1	223-684	Septicolisina (endotoxina)	p2ABAYE (CU459138.1)
ORF2	989-3400	Posible receptor dependiente de TonB	p2ABAYE (CU459138.1)
ORF3	3528-3836	Posible proteína citoplasmática	
ORF4	3829-4125	Posible proteína de membrana interna	
XerC/XerD	4324-4351	Sitio de recombinación	pABVA01 (FM210331.1)
<i>bla</i> _{OXA24}	4425-5252	Carbapenemasa OXA-24	AJ239129
XerD/XerC	5263-5290	Sitio de recombinación	pABVA01 (FM210331.1)
ORF 6	5435-5578	Proteína hipotética	
ORF 7	5590-6165	Proteína de replicación del ADN	
ORF8	6158-7108	Proteína de replicación del ADN	
iteron	7164-7251	3 repeticiones imperfectas iterónicas; control de la replicación del ADN	
oriV	7269-7472	Origen de replicación del ADN	p2ABAYE (CU459138.1)
ORF 9	7776-8048	Proteína hipotética	
ORF 10	8319-8690	Proteína hipotética	
ORF 11	8690-8863	Proteína hipotética	
XerD	8886-8896	Sitio de recombinación	pABVA01 (FM210331.1)

7.3. ANEXO III.

Tabla 1. Cepas próximas filogenéticamente a la cepa clínica de *A. baumannii* AbH120-A2 analizadas con el programa bioinformático RAST (<http://rast.nmpdr.org>).

ID genoma	Score	Nombre del genoma
405416.6	518	<i>Acinetobacter baumannii</i> ACICU
557601.3	500	<i>Acinetobacter baumannii</i> AB900
509173.8	483	<i>Acinetobacter baumannii</i> AYE
400667.4	475	<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978
480119.5	470	<i>Acinetobacter baumannii</i> AB0057
525242.3	469	<i>Acinetobacter</i> sp. 6014059
525243.3	448	<i>Acinetobacter</i> sp. 6013150
557600.3	446	<i>Acinetobacter baumannii</i> AB307-0294
557600.4	434	<i>Acinetobacter baumannii</i> AB307-0294
509170.6	430	<i>Acinetobacter baumannii</i> SDF
575584.3	388	<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606
1100841.3	368	<i>Acinetobacter baumannii</i> TYTH-1
1221244.3	365	<i>Acinetobacter baumannii</i> AB_1536-8
575564.3	361	<i>Acinetobacter</i> sp. RUH2624
1221252.3	359	<i>Acinetobacter baumannii</i> AB_2007-09-110-01-7
592014.3	351	<i>Acinetobacter</i> sp. 6013113
436717.3	347	<i>Acinetobacter</i> sp. DR1
1116235.3	344	<i>Acinetobacter baumannii</i> AB5256
696749.3	339	<i>Acinetobacter baumannii</i> 1656-2
1116236.3	338	<i>Acinetobacter baumannii</i> AB5711
1168588.3	334	<i>Acinetobacter baumannii</i> Ab11111
1116233.3	322	<i>Acinetobacter baumannii</i> AB4857
1168591.3	319	<i>Acinetobacter baumannii</i> Ab44444
1210907.3	305	<i>Acinetobacter baumannii</i> BZICU-2
1198108.3	304	<i>Acinetobacter baumannii</i> AC12
903897.3	303	<i>Acinetobacter baumannii</i> Naval-18
886886.3	293	<i>Acinetobacter baumannii</i> AB210
575565.3	289	<i>Acinetobacter</i> sp. SH024

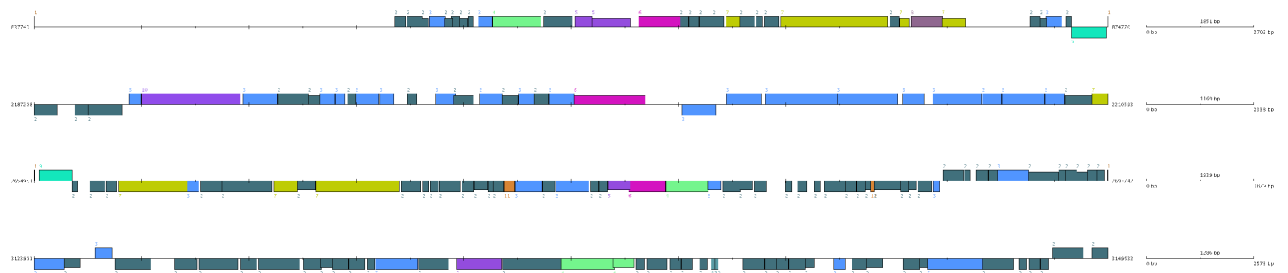
Figura 1. Figura representativa de la isla de resistencia presente en el genoma de la cepa clínica de *A. baumannii* AbH12O-A2.



Locus	Propiedades o supuesta función
LX00_17460	ISAbA 1
LX00_17465	
LX00_17470	dihidropteroato sintasa
LX00_17475	fosfoglucosamina mutasa
LX00_17480	transposasa
LX00_17485	transposasa
LX00_17490	2-aminoglucósido fosfotransferasa (Resistencia a aminoglucósidos)
LX00_17500	transposasa
LX00_17505	β -lactamasa TEM-1 (Resistencia a β -lactámicos)
LX00_17510	aminoglucósido 3-N-acetiltransferasa (Resistencia a aminoglucósidos)
LX00_17515	proteína hipotética
LX00_17520	transposasa
LX00_17530	transposasa
LX00_17535	transposasa
LX00_17545	transposasa
LX00_17550	transportador MFS (Participa en la resistencia a cloranfenicol)
LX00_17555	proteína hipotética truncada
LX00_17560	conjugal transfer protein TraA
LX00_17565	conjugal transfer protein TraD
LX00_17570	proteína hipotética
LX00_17575	proteína hipotética
LX00_17580	3'-kinasa
LX00_17585	aminoglucósido fosfotransferasa
LX00_17590	ISAbA 1
LX00_17595	

Figura 2. A) Representación de los cuatro fagos integrados en el genoma de la cepa clínica de *A. baumannii* AbH12O-A2 obtenidos con el programa bioinformático Phast. En diferentes colores se muestran los distintos genes que codifican las partes necesarias para la formación del fago. . B) Disposición de los fagos en el genoma circular de la cepa clínica de *A. baumannii* AbH12O-A2.

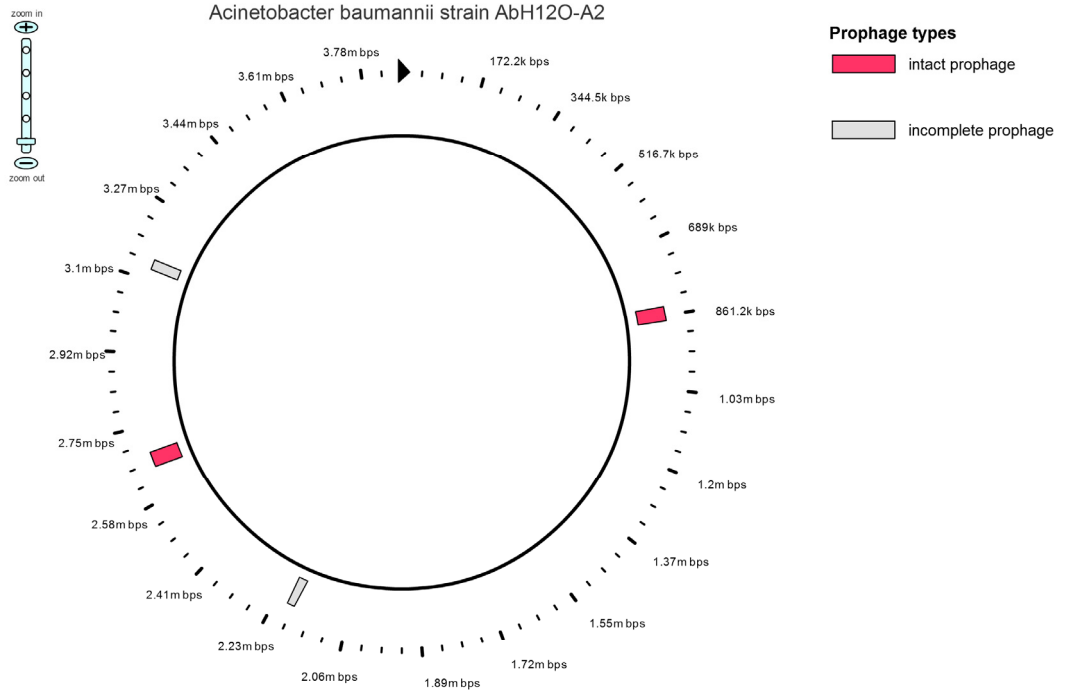
A)



Leyenda:

- 1 Sitio de adhesión
- 2 Proteína hipotética
- 3 Proteína fago-like
- 4 Terminasa
- 5 Proteína de la cabeza
- 6 Proteína del portal
- 7 Proteína del tallo
- 8 Proteína de la fibra
- 9 Integrasa
- 10 Transposasa
- 11 Proteína no perteneciente al fago
- 12 ARNt

B)



Accession: N/A

Length: 3,875,775 bps; Phages: 4

7.4. ANEXO IV

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en el capítulo IV.

Oligonucleótidos	Secuencia	Uso en el estudio
LX00_12105-Up2-NotI-Fw	gCGCGGCCGCCCATAGAAAGAAGCAAGA	Construcción de la cepa <i>knockout</i> isogénica AbH120-A2ΔfhaC
LX00_12105-Up2-Bg/II-Rv	gcagatctgtgtttcactgttagaac	Construcción de la cepa <i>knockout</i> isogénica AbH120-A2ΔfhaC
LX00_12105-Down2-Bg/II-Fw	gcagatctgattaagttcgtgatgg	Construcción de la cepa <i>knockout</i> isogénica AbH120-A2ΔfhaC
LX00_12105-Down2-SphI-Rv	gCGCATGCGGTTGATTGCTGTGCTGA	Construcción de la cepa <i>knockout</i> isogénica AbH120-A2ΔfhaC
LX00_12105-ext-Fw	gtgtaagagttcagagtct	Confirmación de la delección del fragmento del locus LX00_12105
LX00_12105-ext-Rv	cggttccaattgaaaat	Confirmación de la delección del locus LX00_12105
LX00_12105-int-Fw	ccaaactattcgacaacag	Confirmación de la delección del fragmento del locus LX00_12105
LX00_12105-int-Rv	gttgccatgcaagaatcac	Confirmación de la delección del fragmento del locus LX00_12105
pMo130 site2 Fw	attcatgaccgtgctgac	Confirmación de la construcción de la cepa <i>knockout</i> isogénica AbH120-A2ΔfhaC
pMo130 site2 Rv	ctgtctgtaagcggatg	Confirmación de la construcción de la cepa <i>knockout</i> isogénica AbH120-A2ΔfhaC
LX00_12105-ATG-SalI-Fw	gccgtcgacgtgtaatgtagcatgac	Clonación del locus LX00_12105 en el plásmido pWH1266Tpm para la complementación de la cepa <i>knockout</i> AbH120-A2ΔfhaC
LX00_12105-TAA-SalI-Rv	gccgtcgacttaataggtccaattcacg	Clonación del locus LX00_12105 en el plásmido pWH1266Tpm para la complementación de la cepa <i>knockout</i> AbH120-A2ΔfhaC
Tpm-Pprom-HindIII-Fw	gcgaagcttgactccagaggtcaata	Clonación del gen Tpm en el plásmido pWH1266
Tpm-Pprom-HindIII-Rv	gcaagcttcagaactggcagtgagt	Clonación del gen Tpm en el plásmido pWH1266
RT#73-LX00_12105-Fw	caaaacggttatgtaacaacacga	qRT-PCR
RT#73-LX00_12105-Rv	caccgtaccggatgcaata	qRT-PCR
RT#3-LX00_12100-Fw	ctgggcttctgctgaacaa	qRT-PCR
RT#3-LX00_12100-Fw	aataaatccaccccttggtaac	qRT-PCR
RT#76-gyrB-Fw	tctctagtcaggaagtgggtacatt	qRT-PCR
RT#76-gyrB-Rv	ggttatattcttcacggccaat	qRT-PCR

Tabla 2. Datos proteómicos obtenidos con LC-MRM/MS utilizados para diseñar el método MRM. Transiciones y co-eluciones de los péptidos trípticos con carga +2 y +3 analizados para las proteínas AbFhaB y AbFhaC.

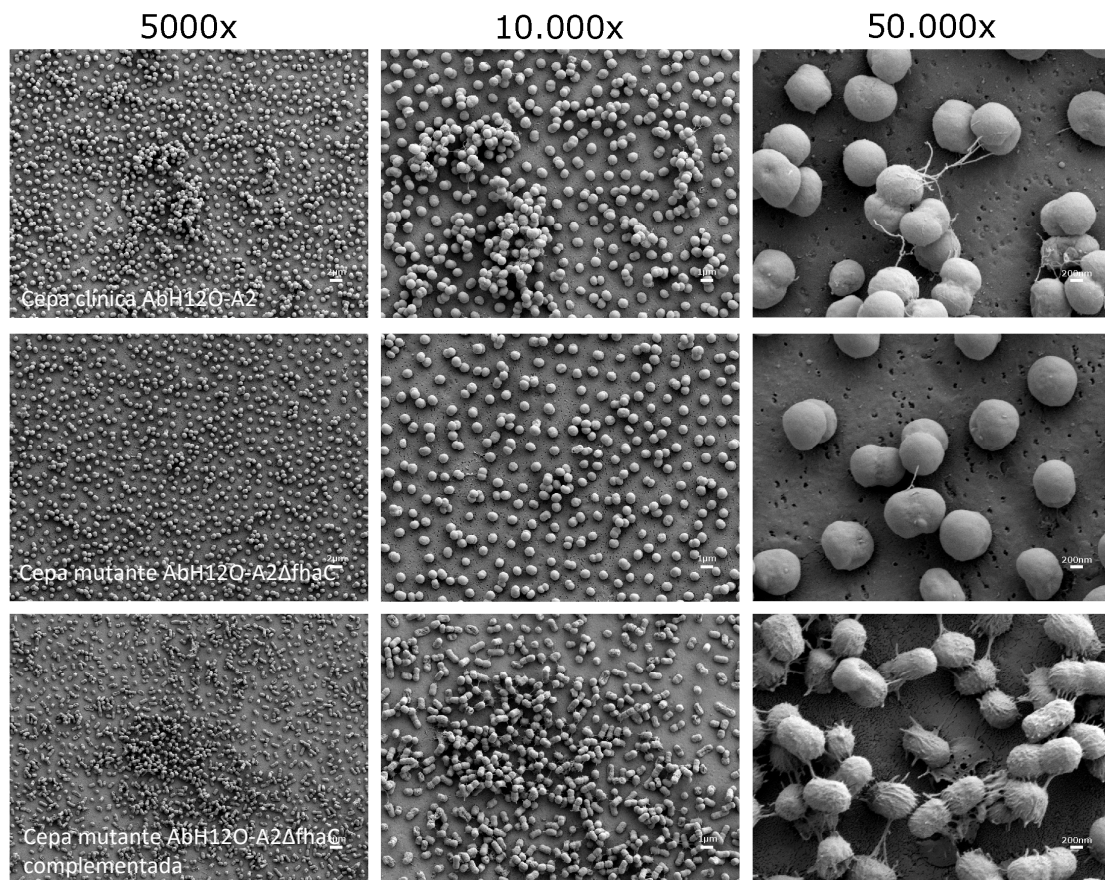
Q1	Q3	Secuencia péptido	DP (voltios)	CE (voltios)	EP	CXP
894,45337	1103,580361	>AbH120_A2_LX00_12100 FhaB.LNQQNSLSNSGTLNAAR.+2y11.light	96,3	41,1	15	35
894,45337	990,496297	>AbH120_A2_LX00_12100 FhaB.LNQQNSLSNSGTLNAAR.+2y10.light	96,3	41,1	15	35
894,45337	903,464269	>AbH120_A2_LX00_12100 FhaB.LNQQNSLSNSGTLNAAR.+2y9.light	96,3	41,1	15	35
894,45337	999,485398	>AbH120_A2_LX00_12100 FhaB.LNQQNSLSNSGTLNAAR.+2b9.light	96,3	41,1	15	35
894,45337	1086,517427	>AbH120_A2_LX00_12100 FhaB.LNQQNSLSNSGTLNAAR.+2b10.light	96,3	41,1	15	35
596,638005	789,421342	>AbH120_A2_LX00_12100 FhaB.LNQQNSLSNSGTLNAAR.+3y8.light	74,6	30	15	35
596,638005	702,389313	>AbH120_A2_LX00_12100 FhaB.LNQQNSLSNSGTLNAAR.+3y7.light	74,6	30	15	35
596,638005	645,367849	>AbH120_A2_LX00_12100 FhaB.LNQQNSLSNSGTLNAAR.+3y6.light	74,6	30	15	35
596,638005	598,29435	>AbH120_A2_LX00_12100 FhaB.LNQQNSLSNSGTLNAAR.+3b5.light	74,6	30	15	35
596,638005	685,326378	>AbH120_A2_LX00_12100 FhaB.LNQQNSLSNSGTLNAAR.+3b6.light	74,6	30	15	35
799,430844	1057,563649	>AbH120_A2_LX00_12100 FhaB.AQDILNDQGQILAAR.+2y10.light	89,4	37,6	15	35
799,430844	943,520721	>AbH120_A2_LX00_12100 FhaB.AQDILNDQGQILAAR.+2y9.light	89,4	37,6	15	35
799,430844	828,493778	>AbH120_A2_LX00_12100 FhaB.AQDILNDQGQILAAR.+2y8.light	89,4	37,6	15	35
799,430844	898,426487	>AbH120_A2_LX00_12100 FhaB.AQDILNDQGQILAAR.+2b8.light	89,4	37,6	15	35
799,430844	1083,506528	>AbH120_A2_LX00_12100 FhaB.AQDILNDQGQILAAR.+2b10.light	89,4	37,6	15	35
533,289654	828,493778	>AbH120_A2_LX00_12100 FhaB.AQDILNDQGQILAAR.+3y8.light	70	26,6	15	35
533,289654	700,435201	>AbH120_A2_LX00_12100 FhaB.AQDILNDQGQILAAR.+3y7.light	70	26,6	15	35
533,289654	643,413737	>AbH120_A2_LX00_12100 FhaB.AQDILNDQGQILAAR.+3y6.light	70	26,6	15	35
533,289654	541,298038	>AbH120_A2_LX00_12100 FhaB.AQDILNDQGQILAAR.+3b5.light	70	26,6	15	35
533,289654	770,367909	>AbH120_A2_LX00_12100 FhaB.AQDILNDQGQILAAR.+3b7.light	70	26,6	15	35
927,947055	1216,584444	>AbH120_A2_LX00_12100 FhaB.IHETGTVTPSYGSYGGK.+2y12.light	98,8	42,3	15	35
927,947055	1115,536765	>AbH120_A2_LX00_12100 FhaB.IHETGTVTPSYGSYGGK.+2y11.light	98,8	42,3	15	35
927,947055	1016,468351	>AbH120_A2_LX00_12100 FhaB.IHETGTVTPSYGSYGGK.+2y10.light	98,8	42,3	15	35
927,947055	940,473437	>AbH120_A2_LX00_12100 FhaB.IHETGTVTPSYGSYGGK.+2b9.light	98,8	42,3	15	35
618,967129	915,420673	>AbH120_A2_LX00_12100 FhaB.IHETGTVTPSYGSYGGK.+3y9.light	76,2	31,3	15	35
618,967129	818,367909	>AbH120_A2_LX00_12100 FhaB.IHETGTVTPSYGSYGGK.+3y8.light	76,2	31,3	15	35

618,967129	731,335881	>AbH120_A2_LX00_12100 FhaB.IHETGTVTPSYGSYGGK.+3y7.light	76,2	31,3	15	35
618,967129	740,357344	>AbH120_A2_LX00_12100 FhaB.IHETGTVTPSYGSYGGK.+3b7.light	76,2	31,3	15	35
618,967129	839,425758	>AbH120_A2_LX00_12100 FhaB.IHETGTVTPSYGSYGGK.+3b8.light	76,2	31,3	15	35
554,31148	810,410442	>AbH120_A2_LX00_12105 FhaC.IIANGYVTTR.+2y7.light	71,5	28,8	15	35
554,31148	696,367515	>AbH120_A2_LX00_12105 FhaC.IIANGYVTTR.+2y6.light	71,5	28,8	15	35
554,31148	639,346051	>AbH120_A2_LX00_12105 FhaC.IIANGYVTTR.+2y5.light	71,5	28,8	15	35
554,31148	832,45633	>AbH120_A2_LX00_12105 FhaC.IIANGYVTTR.+2b8.light	71,5	28,8	15	35
369,876745	639,346051	>AbH120_A2_LX00_12105 FhaC.IIANGYVTTR.+3y5.light	58,1	17,7	15	35
369,876745	476,282723	>AbH120_A2_LX00_12105 FhaC.IIANGYVTTR.+3y4.light	58,1	17,7	15	35
369,876745	377,214309	>AbH120_A2_LX00_12105 FhaC.IIANGYVTTR.+3y3.light	58,1	17,7	15	35
369,876745	412,255445	>AbH120_A2_LX00_12105 FhaC.IIANGYVTTR.+3b4.light	58,1	17,7	15	35
369,876745	469,276909	>AbH120_A2_LX00_12105 FhaC.IIANGYVTTR.+3b5.light	58,1	17,7	15	35
369,876745	632,340238	>AbH120_A2_LX00_12105 FhaC.IIANGYVTTR.+3b6.light	58,1	17,7	15	35
503,266207	809,40396	>AbH120_A2_LX00_12105 FhaC.VPTVEADFK.+2y7.light	67,8	27	15	35
503,266207	708,356282	>AbH120_A2_LX00_12105 FhaC.VPTVEADFK.+2y6.light	67,8	27	15	35
503,266207	609,287868	>AbH120_A2_LX00_12105 FhaC.VPTVEADFK.+2y5.light	67,8	27	15	35
503,266207	526,287139	>AbH120_A2_LX00_12105 FhaC.VPTVEADFK.+2b5.light	67,8	27	15	35
503,266207	597,324253	>AbH120_A2_LX00_12105 FhaC.VPTVEADFK.+2b6.light	67,8	27	15	35
503,266207	712,351196	>AbH120_A2_LX00_12105 FhaC.VPTVEADFK.+2b7.light	67,8	27	15	35
559,296027	788,426093	>AbH120_A2_LX00_12105 FhaC.SELINADLSR.+2y7.light	71,9	29	15	35
559,296027	675,342029	>AbH120_A2_LX00_12105 FhaC.SELINADLSR.+2y6.light	71,9	29	15	35
559,296027	561,299101	>AbH120_A2_LX00_12105 FhaC.SELINADLSR.+2y5.light	71,9	29	15	35
802,912621	1078,568006	>AbH120_A2_LX00_12105 FhaC.VGQQNLQYLAEWR.+2y8.light	89,6	37,8	15	35
802,912621	965,483942	>AbH120_A2_LX00_12105 FhaC.VGQQNLQYLAEWR.+2y7.light	89,6	37,8	15	35
802,912621	837,425364	>AbH120_A2_LX00_12105 FhaC.VGQQNLQYLAEWR.+2y6.light	89,6	37,8	15	35
802,912621	931,463206	>AbH120_A2_LX00_12105 FhaC.VGQQNLQYLAEWR.+2b8.light	89,6	37,8	15	35
802,912621	1115,584384	>AbH120_A2_LX00_12105 FhaC.VGQQNLQYLAEWR.+2b10.light	89,6	37,8	15	35
535,610839	837,425364	>AbH120_A2_LX00_12105 FhaC.VGQQNLQYLAEWR.+3y6.light	70,2	26,7	15	35
535,610839	674,362036	>AbH120_A2_LX00_12105 FhaC.VGQQNLQYLAEWR.+3y5.light	70,2	26,7	15	35
535,610839	561,277972	>AbH120_A2_LX00_12105 FhaC.VGQQNLQYLAEWR.+3y4.light	70,2	26,7	15	35

Anexo IV

535,610839	640,3413	>AbH12O_A2_LX00_12105 FhaC.VGQQNLQYLAEWR.+3b6.light	70,2	26,7	15	35
------------	----------	--	------	------	----	----

Figura 1. Microscopía electrónica de barrido (SEM) de la formación de biofilm tras 5 días sobre superficies de poliestireno en la interfase aire-líquido de la cepa de la *A. baumannii* AbH120-A2 (micrografías de la fila superior del panel), de la cepa mutante isogénica AbH120-A2 Δ fhaC (fila central del panel) y de la cepa mutante isogénica AbH120-A2 Δ fhaC complementada (micrografías de la fila inferior del panel). Todas las micrografías fueron tomadas a 5.000, 10.000 y 50.000 aumentos.



7.5. ANEXO V. *Currículum vitae*

MARÍA MERINO CARBALLEIRA

INFORMACIÓN PERSONAL

Nombre: María Merino Carballeira
 Nacionalidad: Española
 Fecha de nacimiento: 1983

INFORMACIÓN DE CONTACTO:

Teléfono: +34 630351466
 Email: maria.merino.carballeira@gmail.com
 Dirección: Calle Jose María Hernansaez, 29-3ºDcha 15009 A Coruña (España)

Experiencia profesional

Investigadora predoctoral

Oct 2009- Agost 2015

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

Desarrollo de la tesis doctoral titulada: Estudio de un brote epidémico causado por distintas cepas de *Acinetobacter baumannii* multirresistente. Estudio de la epidemividad y virulencia

Estudiante en prácticas de máster universitario

Oct 2008 - Jun 2009

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

Desarrollo del proyecto de máster titulado: Estudio de un brote epidémico causado por distintas cepas de *Acinetobacter baumannii* multirresistente. Estudio de la epidemividad y virulencia

Asistente voluntaria

Ene 2008 – Oct 2008

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

- Preparación de material y medios de cultivo para bacteriología.
- Técnicas de biología molecular y microbiológicas

Educación

Oct 2009 – Jun 2010

Máster Universitario en Asistencia e Investigación Sanitaria
 Facultad de Ciencias de la salud (Universidad de A Coruña)

Sept 2001 – Dic 2007

Licenciatura en Biología
 Facultad de Biología (Universidad de A Coruña)

Cursos

Sept 2013

Bioinformatic Tools in Clinical Microbiology
ESCMID Postgraduate Technical Workshop, Santander

Conocimiento de las herramientas bioinformáticas utilizadas en microbiología a través de la secuenciación de genomas

Oct 2007- Abr 2008

Curso de Adaptación Pedagógica (CAP)
Universidad de A Coruña, España

Configuración del Sistema Educativo
Técnicas y metodologías para aumentar la interacción en educación.
Prácticas en enseñanza secundaria

Participación en Proyectos de Investigación

PS08/24. Estudio de las diferencias de expresión génica asociadas con resistencia a antibióticos en *Acinetobacter baumannii*. Consellería de Sanidade, Xunta de Galicia. 2008-2011. IP: Margarita Poza Domínguez

PI09/917. Impacto del aumento del consumo de amoxicilina/ ácido clavulánico sobre la epidemiología y la resistencia a amoxicilina/ ácido clavulánico y otros antibióticos en *Escherichia coli* en España. ISCIII-FIS. 2009-2012. IP: Jesús Oteo Iglésias.

PI11/01034. Genómica y transcriptómica de biofilms de *Acinetobacter baumannii*. ISCIII-FIS. 2012-2014. IP: Margarita Poza Domínguez

PI14/00059. Nuevas estrategias frente al patógeno multirresistente *Acinetobacter baumannii*: silenciamiento (siRNA) bacteriano y nuevos inhibidores químicos. Evaluación en estudios preclínicos. 2015-2017. IPs: Margarita Poza Domínguez y Alejandro Beceiro Casas.

PI15/01172. Actividad de biocidas en *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa (CP): Efecto en la supervivencia, formación de biocapas, expresión génica y la movilización de los genes de CP. ISCIII-FIS. 2015-2018. IP: Felipe Fernández-Cuenca.

Publicaciones

- 2015**
- Palacios-Baena ZR, Oteo J, Conejo C, Larrosa MN, Bou G, Fernández-Martínez M, González-López JJ, Pintado V, Martínez-Martínez L, **Merino M**, Pomar V, Mora-Rillo M, Rivera MA, Oliver A, Ruiz-Carrascoso G, Ruiz-Garbajosa P, Zamorano L, Bautista V, Ortega A, Morales I, Pascual Á, Campos J, Rodríguez-Baño J; GEIH-GEMARA (SEIMC) and REIPI Group for CPE. Comprehensive clinical and epidemiological assessment of colonisation and infection due to carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Spain. *J Infect.* 2015 Nov 4. pii: S0163-4453(15)00343-6. (Índice de impacto: 4.441)
 - Álvarez-Fraga L, López M, **Merino M**, Rumbo-Feal S, Tomás M, Bou G, Poza M. Draft Genome Sequence of the Biofilm-Hyperproducing *Acinetobacter baumannii* Clinical Strain MAR002. *Genome Announc.* 2015 Jul 23;3(4). (Índice de impacto: -)
 - Oteo J, Ortega A, Bartolomé R, Bou G, Conejo C, Fernández-Martínez M, González-López JJ, Martínez-García L, Martínez-Martínez L, **Merino M**, Miró E, Mora M, Navarro F, Oliver A, Pascual Á, Rodríguez-Baño J, Ruiz-Carrascoso G, Ruiz-Garbajosa P, Zamorano L, Bautista V, Pérez-Vázquez M, Campos J; GEIH-GEMARA (SEIMC) and REIPI. Prospective multicenter study of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from 83 hospitals in Spain reveals high in vitro susceptibility to colistin and meropenem. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Jun; 59(6):3406-12. (Índice de impacto: 4.451)
- 2014**
- **Merino M**, Alvarez-Fraga L, Gómez MJ, Aransay AM, Lavín JL, Chaves F, Bou G, Poza M. Complete Genome Sequence of the Multiresistant *Acinetobacter baumannii* Strain AbH120-A2, Isolated during a Large Outbreak in Spain. *Genome Announc.* 2014 Nov 13;2(6). (Índice de impacto: -).
 - **Cayó R***, **Merino M***, Ruiz Del Castillo B, Cano ME, Calvo J, Bou G, Martínez-Martínez L. OXA-207, a novel OXA-24 variant with reduced catalytic efficiency against the carbapenems in *Acinetobacter pittii* from Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Jun 2. pii: AAC.02633-13. [Epub ahead of print] (Índice de impacto: 4.451)
- 2013**
- **Merino M**, Poza M, Roca I, Barba MJ, Sousa MD, Vila J, Bou G. Nosocomial Outbreak of a Multiresistant *Acinetobacter baumannii* Expressing OXA-23 Carbapenemase in Spain. *Microb Drug Resist.* 2013 Dec 11. [Epub ahead of print]. (Índice de impacto: 2.524)
 - Rodríguez-Baño J, Oteo J, Ortega A, Villar M, Conejo MC, Bou G, Aranzamendi-Zaldumbide M, Cercenado E, Gurguí M, Martínez-Martínez L, **Merino M**, Rivera A, Oliver A, Weber I, Pascual A, Bartolomé RM, González-López JJ, Campos J. Epidemiological and clinical complexity of amoxicillin-clavulanate-resistant *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 2013 Jul; 51(7):2414-7. (Índice de impacto: 4.232)
- 2012**
- Ortega A, Oteo J, Aranzamendi-Zaldumbide M, Bartolomé RM, Bou G, Cercenado E, Conejo MC, González-López JJ, Marín M, Martínez-Martínez L, **Merino M**, Navarro F, Oliver A, Pascual A, Rivera A, Rodríguez-Baño J, Weber I, Aracil B, Campos J. Spanish multicenter study of the epidemiology and mechanisms of amoxicillin-clavulanate resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Jul; 56(7):3576-81. (Índice de impacto: 4.451)
 - Pérez A, Poza M, Fernández A, Fernández Mdel C, Mallo S, **Merino M**, Rumbo-Feal S, Cabral MP, Bou G. Involvement of the AcrAB-TolC efflux pump in the resistance, fitness, and virulence of *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Apr; 56(4):2084-90. (Índice de impacto: 4.451)

- 2011**
- Acosta J*, **Merino M***, Viedma E, Poza M, Sanz F, Otero JR, Chaves F, Bou G. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* Harboring OXA-24 carbapenemase, Spain. *Emerg Infect Dis.* 2011 Jun; 17(6):1064-7. (Índice de impacto 7.33)
 - Rumbo C*, Fernández-Moreira E*, **Merino M***, Poza M, Mendez JA, Soares NC, Mosquera A, Chaves F, Bou G. Horizontal transfer of the OXA-24 carbapenemase gene via outer membrane vesicles: a new mechanism of dissemination of carbapenem resistance genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Jul; 55(7):3084-90. (Índice de impacto: 4.451)
- 2010**
- **Merino M***, Pérez-Llarena FJ, Kerff F, Poza M, Mallo S, Rumbo-Feal S, Beceiro A, Juan C, Oliver A, Bou G. Role of changes in the L3 loop of the active site in the evolution of enzymatic activity of VIM-type metallo-beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother.* 2010 Sep; 65(9):1950-4. (Índice de impacto: 5.439)
 - **Merino M***, Acosta J*, Poza M, Sanz F, Beceiro A, Chaves F, Bou G. OXA-24 carbapenemase gene flanked by XerC/XerD-like recombination sites in different plasmids from different *Acinetobacter* species isolated during a nosocomial outbreak. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Jun; 54(6):2724-7. (Índice de impacto: 4.451)

Comunicaciones y pósters

- 2015**
- L. Alvarez-Fraga, S. Rumbo-Feal, **M. Merino**, J. A. Vallejo, M. Lopez, A. Perez, E. J. Ohneck, L. A. Actis, G. Bou, M. Poza. Whole genome analysis of a biofilm hyper-producing clinical strain of *Acinetobacter baumannii* revealed a spoU gene involved in biofilm formation, attachment and invasiveness. 25th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, ECCMID April 2015 Copenhagen, Denmark.
 - **M. Merino**, L. Alvarez-Fraga, S. Rumbo-Feal, J. A. Vallejo, A. Perez, E. J. Ohneck, L. A. Actis, M. Poza, G. Bou. Whole genome analysis of the *Acinetobacter baumannii* strain AbH12O-A2 causing a large outbreak revealed a FhaB/FhaC-like two partner secretion system involved in adhesion. 25th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, ECCMID April 2015 Copenhagen, Denmark.
- 2014**
- **Nov'14 M. Merino.** Genómica y proteómica aplicada al estudio de resistencia antibiótica y virulencia bacteriana. Ponente en las IX Jornadas Científicas de la Red Española de Investigación en Patología Infecciosa. Salón de Actos, Hospital 12 de Octubre, Madrid.
 - J. Oteo, C. Conejo, M. Fernández-Martínez, J. González-López, L. Martínez-García, **M. Merino**, E. Miró, G. Ruíz, L. Zamorano, Spanish collaborating group for the study of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Spain: results from a national multi-centre study, 2013. 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, ECCMID May 2014, Barcelona, España.
- 2013**
- M.P. Cabral, C. Rumbo, **M. Merino**, A. Beceiro, M. Poza, A. Pérez, G. Bou Arévalo.

Blockade of glutamate racemisation during cell-wall formation prevents biofilms and proliferation of *Acinetobacter baumannii* in vivo. 23th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, ECCMID April 2013, Berlin, Germany.

- 2012**
- **M. Merino**, M. Poza, M. J. Barba, S. Rumbo-Feal, A. Fernández, M. Tomás, G. Bou. First Outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-23 in Spain. 52th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, American Society for Microbiology, ICAAC September 2012, Denver, USA. **Comunicación Oral**
 - A. Ortega*, V. Bautista, R.M. Bartolomé, E. Cercenado, M.C. Conejo, L. Martínez-Martínez, **M. Merino**, B. Mirelis, I. Weber, J. Campos, J. Oteo. Resistance mechanisms to amoxicillin-clavulanate in *Escherichia coli*: molecular epidemiology of inhibitor-resistant TEM and OXA-1- producing isolates. 22th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, ECCMID April 2012, London, England.
 - J. Oteo, A. Ortega, R. Bartolomé, E. Cercenado, C. Conejo, L. Martínez-Martínez, **M. Merino**, F. Navarro, J. Rodríguez-Baño, I. Weber, V. Bautista, J. Campos y Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI-ISCI). Estructura poblacional de *Escherichia coli* resistente a amoxicilina/ácido clavulánico productor de OXA-1. XVI Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), Mayo 2012, Bilbao.
 - M. Pérez, M.D.M. Tomás, **M. Merino**, L.M. Moldes, M. Oviaño, F. Molina y G. Bou. Sensibilidad disminuida a cefepime en *Escherichia coli* aislados en muestras urinarias del área de A Coruña portadores de la β -lactamasa OXA-1. XVI Congreso Reunión de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), Mayo 2012, Bilbao.
 - **M. Merino**, M. Poza, A. Beceiro, S. Rumbo-Feal, A. Fernández, R. Villanueva, M. Rodríguez, M. Tomás y G. Bou. Primer brote en España producido por una cepa de *Acinetobacter baumannii* multiresistente productora de la β -lactamasa OXA-23. XVI Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), Mayo 2012, Bilbao. **Comunicación Oral**.
 - A. Fernández, **M. Merino**, P.G. Higgins, E. Zander, M. Hackel, G. Bou y H. Seifer. Utilización de métodos moleculares como herramienta para la correcta identificación de *Acinetobacter baumannii*. XVI Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), Mayo 2012, Bilbao.
- 2011**
- J. Rodríguez-Baño, A. Ortega, M. Villar, C. Conejo, **M. Merino**, M. Aranzamendi, E. Cercenado, M. Gurguí, L. Martínez-Martínez, A. Rivera, A. Oliver, A. Pascual, R. Bartolomé, A. Coelho, J. Campos y J. Oteo. Diversidad epidemiológica y clínica de *Escherichia coli* en función del mecanismo de resistencia a amoxicilina/ácido

clavulánico. XV Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), Junio 2011, Málaga.

- A. Ortega, V. Bautista, M. Aranzamendi, G. Bou, E. Cercenado, C. Conejo, J.J. González-López, **M. Merino**, B. Mirelis, F. Navarro, A. Oliver, A. Pascual, G. Prats, I. Weber, J. Campos y J. Oteo. Estudio multicéntrico de la resistencia a amoxicilina/ácido clavulánico en *Escherichia coli*: mecanismos moleculares y epidemiología molecular. XV Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), Junio 2011, Málaga.
 - A. Pérez, M. Poza, M. Fernández, E. López, A. Fernández, S. Mallo, **M. Merino**, S. Rumbo-Feal, M. Pova y G. Bou. Reducción de la *fitness* en *Enterobacter cloacae* debido a la pérdida de un componente estructural de bomba de expulsión ACRAB-TOLC. XV Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), Junio 2011, Málaga.
- 2010**
- **M. Merino**, J. Acosta, M. Poza, JR. Otero, R. Villanueva, F. Chaves, G. Bou. Description a multiresistant and highly invasive ST56 clone of *Acinetobacter baumannii* carrying the carbapenemase OXA-24. 50th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, American Society for Microbiology, ICAAC September 2010, Boston, USA.
 - C. Rumbo-Lorenzo, E. Fernández-Moreira, A. Mosquera, **M. Merino**, M. Poza, F. Chavez, G. Bou. Outer Membrane Vesicle (OMV)-Mediated Horizontal Transfer of the OXA-24 Carbapenemase Gene from Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii* to other Bacteria. 50th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, American Society for Microbiology, ICAAC September 2010, Boston, USA.
 - **M. Merino**, F.J. Pérez-Llarena, S. Mallo, M. Poza, S. Rumbo-Feal, C. Juan, F. Kerff, A. Beceiro, A. Oliver y G. Bou. Cambios en El loop L3 del centro activode La metalo- β -lactamasa VIM-13 explican las diferencias enzimáticas y la evolución entre lãs enzimas VIM-1 y VIM-13. XIV Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), Mayo 2010, Barcelona. **Comunicación Oral.**
 - **M. Merino**, J. Acosta, M. Poza, E. Viedma, F. Sanz, J.R. Otero, R. Villanueva, F. Chaves y G. Bou. Descripción de un clon de *Acinetobacter baumannii* ST56 altamente invasivo portador de la carbapenemasa OXA-24. XIV Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), Mayo 2010, Barcelona. **Comunicación Oral.**
- 2009**
- **M. Merino**, F.J. Perez-Llarena, S. Mallo, M. Poza, C. Juan, A. Oliver, G. Bou. Changes in the Loop L3 of the active site of VIM-13 metallo- β -lactamases explain enzymatic differences between VIM-1 and VIM-13. 49th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, American Society for Microbiology,

ICAAC September 2009, San Francisco, USA.

- J. Acosta, **M. Merino**, E. Viedma, G. Bou, F. Sanz, J.R. Otero y F. Chaves. Bacteriemias relacionadas con un clon multirresistente de *Acinetobacter baumannii*: epidemiología molecular e impacto clínico. XIII Reunión de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), Junio 2009, Sevilla.
- 2008**
- **M. Merino**, J. Acosta, A. Beceiro, F. Chaves, C. Gayoso, M. Poza, G. Bou. Epidemic *Acinetobacter baumannii* (Ab) strain harboring a plasmid expressing OXA-24 carbapenemase enzyme. 48th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, American Society for Microbiology, ICAAC October 2008, Washington DC, USA.

Reconocimientos y premios

- 2012 Premio a la mejor comunicación: “Primer brote en España producido por una cepa de *Acinetobacter baumannii* multirresistente productora de la β -lactamasa OXA-23” XVI Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica, Bilbao.
- 2010 Premio a la mejor comunicación: “Cambios en el loop L3 del centro activo de la metalo- β -lactamasa VIM-13 explican las diferencias enzimáticas y la evolución entre las enzimas VIM-1 y VIM-13” XIV Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica, Barcelona.
- 2010 Premio al mejor trabajo en el campo de XXXXXXXX “Description a multiresistant and highly invasive ST56 clone of *Acinetobacter baumannii* carrying the carbapenemase OXA-24” 50th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), Boston

