



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Genómica comparativa de 5 especies del género *Acinetobacter* de
aislados clínicos y ambientales

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Oscar Alberto Fernández Taboada

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos
Centro de Ciencias Genómicas (CCG – UNAM)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Katy Juárez López
Instituto de Biotecnología (IBT- UNAM)

Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán
Instituto de Biotecnología (IBT- UNAM)

Cuernavaca, Morelos. Febrero, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Instituto de Biotecnología
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



Centro de Ciencias Genómicas

Esta tesis se realizó bajo el programa de Posgrado en Ciencias Bioquímicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección del Dr. Miguel A. Cevallos, en el Programa de Genómica Evolutiva del Centro de Ciencias Genómicas (CCG-UNAM).

Durante mis estudios recibí una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) número 417344. Mi trabajo también lo apoyó un Donativo de CONACyT (253070).

AGRADECIMIENTOS TÉCNICOS

A la M. en B. **María de los Ángeles Pérez Oseguera** por el apoyo técnico durante el proyecto.

Al Dr. **Luis Fernando Lozano Aguirre Beltrán** por el soporte técnico en el desarrollo bioinformático del proyecto.

Al Dr. **Santiago Castillo Ramírez** y a su alumna de doctorado **Lucia Graña Miraglia** por los consejos académicos para sacar adelante el proyecto, muchas gracias por su tiempo.

A la Dra. **Katy Juárez López** y el Dr. **Víctor Humberto Bustamante Santillán** por ser miembros de mi comité tutor, por su gran apoyo y tiempo para mejorar el proyecto de Maestría.

Muchas gracias a mi jurado de examen de Titulación:

- Dra. **Susana Brom Klanner**, Centro de Ciencias Genómicas (CCG - UNAM).
- Dra. **Luary Carolina Martínez Chavarría**, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ - UNAM).
- Dr. **Santiago Castillo Ramírez**, Centro de Ciencias Genómicas (CCG - UNAM).
- Dr. **Ernesto Ortiz Suri**, Instituto de Biotecnología (IBT - UNAM).
- Dr. **Lorenzo Patrick Segovia Forcella**, Instituto de Biotecnología (IBT - UNAM).

Por sus observaciones y correcciones de la tesis que mejoraron la presentación de mi proyecto de Maestría.

Al Dr. **Miguel Ángel Cevallos Gaos** por aceptarme y abrirme las puertas del departamento de Genómica Evolutiva del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM y por ser mi mentor durante la Maestría.

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada, quisiera agradecer de todo corazón a mi familia por el apoyo incondicional que recibo todos los días de ustedes, acompañado de inmenso cariño, fuerza, bienestar y enseñanzas, motivos que me impulsan a ser una mejor persona y que han marcado mi camino, mi vida.

A mis padres, **Modesta Taboada Román** y **Guillermo Fernández Miranda** por los valores inculcados y los sacrificios que han realizado, son mi máximo ejemplo a seguir.

A mi hermano, **Guillermo Fernandez Taboada** por tu apoyo incondicional, por ser el mejor compañero y sopote de mi vida.

A mi novia **Leslye Rocio Ortiz Lozano** por estar a mi lado todo este tiempo, por alegrar siempre mis días y ser mi motivo para mejorar como persona.

A mis amigos del Programa de Genómica Evolutiva: **Soledad Juárez, Irma Martínez, Ángeles Pérez, Semiramis Castro, Ivana Blancas, Yamilet, Tania, Claudia Mayoral, Abraham Salgado, Luis Lozano** y **Fernando Martínez** por su valiosa amistad y hacer mis días en el laboratorio muy agradables.

A mis amigos incondicionales de la carrera **Rafael Maldonado Bravo, Edgardo Madrid Paulino** y **Cesar Trejo Moreno**.

Al Equipo de Profesionales Team Matrix Global, a mi mentora **Lucero Blásquez** por ayudarme a encontrar mi camino y guiarme en la búsqueda de la realización de mis sueños.

A todos ¡GRACIAS!

ÍNDICE

Página

ÍNDICE GENERAL.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	iv
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 Infecciones hospitalarias.....	2
1.2 Resistencia a antibióticos.....	3
1.3 Elementos genéticos móviles (MGEs).....	7
1.3.1 Plásmidos.....	8
1.3.2 Transposones.....	8
1.3.3 Secuencias de inserción (IS)	9
1.3.4 Integrones.....	10
1.3.5 Elementos conjugativos e integrativos (ICEs)	11
1.4 Características del género <i>Acinetobacter</i>	12
1.5 <i>Acinetobacter baumannii</i> (Complejo <i>calcoaceticus-baumannii</i>)	14
1.6 Dificultades en la identificación de especies y patógenos emergentes del género <i>Acinetobacter</i>	17
1.7 Herramientas de vigilancia epidemiológicas.....	20
1.8 Pregunta de investigación.....	24
2. ANTECEDENTES.....	24
2.1 El concepto de pangenoma.....	24
2.2 Resistencia a los antibióticos.....	25
3. HIPÓTESIS	27
4. OBJETIVOS	28
4.1 Objetivo general	28
4.2 Objetivos particulares	28
5. MATERIALES Y MÉTODOS	29
5.1 Diagrama del desarrollo experimental.....	29
5.2 Cepas bacterianas y medios de cultivo.....	29
5.3 Obtención de muestras clínicas de diferentes hospitales de México.....	34
5.4 Extracción de ADN genómico.....	34
5.5 Perfil de plásmidos (Eckhardt)	34
5.6 Amplificación de los genes <i>rpoB</i> y <i>16S</i>	35
5.7 Secuenciación del genoma completo (WGS).....	35
5.8 Caracterización del pangenoma y análisis filogenético.....	36
5.9 Identificación de genes únicos hospitalarios y ambientales.....	36
5.10 Identidad nucleotídica promedio (ANI).....	37

5.11 Presencia de secuencias CRISPR, fagos y resistencia a antibióticos en genomas de aislados clínicos y ambientales de <i>Acinetobacter</i>	37
5.12 Lista de genes de virulencia de <i>Acinetobacter baumannii</i>	38
6. RESULTADOS	38
6.1 Secuenciación del genoma de tres aislados clínicos de <i>Acinetobacter</i> (no <i>baumannii</i>)	38
6.2 Ensamblado de secuencias <i>de novo</i>	40
6.3 Identificación a nivel de especie de los aislados clínicos mexicanos.....	42
6.4 Resistencia a antibióticos de los aislados clínicos mexicanos.....	45
6.5 Selección de especies de <i>Acinetobacter</i> para el estudio.....	46
6.6 Clasificación taxonómica correcta de las especies de <i>Acinetobacter</i>	47
6.7 Caracterización del pangenoma, genes accesorios y genes únicos	50
6.8 Lista de genes de virulencia de <i>Acinetobacter baumannii</i>	65
6.9 Presencia de secuencias CRISPR, fagos y genes de resistencia a antibióticos en genomas de aislados clínicos y ambientales de <i>Acinetobacter</i>	68
7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	75
8. PERSPECTIVAS	82
9. BIBLIOGRAFÍA	83
10. Anexos	90
10.1 Anexo I. Script utilizado para la Identificación de genes únicos hospitalarios y ambientales, sección 5.9.....	90
10.2 Anexo II. Genes presentes únicamente en aislados clínicos.....	91
10.3 Anexo III. Genes presentes únicamente en aislados clínicos sin asignación COG.....	92
10.4 Anexo IV. Genes presentes únicamente en aislados ambientales.....	94
10.5 Anexo V. Genes presentes únicamente en aislados ambientales sin asignación COG	96
10.6 Anexo VI. Base de datos de los 92 genes asociados a factores de virulencia identificados en <i>Acinetobacter baumannii</i> utilizados en este estudio, sección 6.8.....	97

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Los diferentes elementos en la resistencia bacteriana a los antibióticos.....	4
Figura 2. Transferencia horizontal de genes.....	6
Figura 3. Variedad de elementos genéticos móviles en procarionta.....	7
Figura 4. Estructura de un plásmido.....	8
Figura 5. Estructura general de los integrones de clase 1.....	10
Figura 6. Cultivo y microscopía electrónica por barrido de <i>Acinetobacter baumannii</i>	14
Figura 7. ADN total de las 3 muestras clínicas de <i>Acinetobacter</i>	39
Figura 8. Perfil de plásmidos de las 3 cepas clínicas mexicanas de <i>Acinetobacter</i>	40
Figura 9. Cálculo del porcentaje de identidad nucleotídica(ANI).....	48
Figura 10. Dendograma del gen <i>rpoB</i> de las 52 cepas de <i>Acinetobacter</i> utilizadas en el estudio.....	50
Figura 11. Identificación del pangenoma, genes accesorios y genes únicos de las cepas 5 especies de <i>Acinetobacter</i>	52
Figura 12. Distribución del pangenoma de acuerdo a la clasificación funcional COG	53
Figura 13. Asignación de funcionalidad general (COG) a genes relacionados a virulencia	56
Figura 14. Mapa de calor del pangenoma de las 52 cepas de <i>Acinetobacter</i>	57
Figura 15. Árbol filogenético de las 52 cepas de <i>Acinetobacter</i>	58
Figura 16. Identificación de los genes hábitat-específicos de las 5 especies de <i>Acinetobacter</i>	59
Figura 17. Mapa de calor de 92 genes asociados a virulencia en <i>A. baumannii</i>	66
Figura 18. Presencia de secuencias CRISPR, fagos y genes de resistencia a antibióticos en genomas de aislados clínicos y ambientales de <i>Acinetobacter</i>	71

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en este estudio	29
Tabla 2. Datos de secuenciación y ensamblado de las cepas utilizadas en el estudio.....	31
Tabla 3. Ensamble <i>de novo</i> de las cepas <i>A. LRGC003</i> , <i>A. 971H</i> y <i>A. 10639</i>	41
Tabla 4. Cálculo del ANI de las cepas de <i>A. junii</i> y <i>A. soli</i>	43
Tabla 5. Comparación de las características generales de los 3 aislados clínicos mexicanos.	44
Tabla 6. Genes de resistencia de las 3 cepas clínicas mexicanas de <i>Acinetobacter</i>	46
Tabla 7. Identificación del pangenoma de las 5 especies del género <i>Acinetobacter</i>	51
Tabla 8. Número de genes asociados a factores de virulencia de las 5 especies de <i>Acinetobacter</i> utilizadas en el estudio.....	54
Tabla 9. Genes presentes únicamente en aislados clínicos.....	60
Tabla 10. Genes presentes en todos los aislados clínicos y ausentes en todos los aislados ambientales	64
Tabla 11. Genes presentes en todos los aislados ambientales y ausentes en todos los aislados clínicos	65
Tabla 12. Genes compartidos por todas las cepas de <i>Acinetobacter</i> utilizadas en el estudio asociados a factores de virulencia de <i>A. baumannii</i>	67
Tabla 12.1. Genes asociados a factores de virulencia de <i>A. baumannii</i> presentes en 51 aislados de un total de 52 cepas de <i>Acinetobacter</i> utilizadas en el estudio.....	67
Tabla 13. Identificación de los 19 genes <i>core</i> asociados a factores de virulencia de <i>Acinetobacter</i> en otros organismos.....	68
Tabla 14. Identificación de genes de resistencia a los antibióticos en el genoma <i>core</i> , genoma accesorio y genes únicos de las 5 especies de <i>Acinetobacter</i>	72

RESUMEN

Las especies del género *Acinetobacter* son organismos omnipresentes en la naturaleza y tienen la habilidad de ocupar diferentes nichos ecológicos. A la fecha, el género contiene 53 especies pero solamente una fracción es la responsable de la mayoría de los brotes epidemiológicos hospitalarios cuando se trata de infecciones causadas por *Acinetobacter*. Debido a que son especies estrechamente relacionadas se agrupan dentro de un mismo complejo llamado ACB (*Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*). En los últimos años, los reportes por infecciones nosocomiales causados por especies que no pertenecen al complejo ACB han incrementado y existen pocos estudios disponibles sobre las características de virulencia que establezcan a estos organismos como potenciales patógenos emergentes en hospitales.

Este es el primer estudio realizado con especies de *Acinetobacter* donde se analizan los genomas de aislados clínicos y ambientales de especies que no pertenecen al complejo ACB (*A. junii*, *A. soli*, *A. radioresistens* y *A. johnsonii*). Se determinó el genoma core, los genes accesorios y genes únicos de cada especie y se identificaron 66 genes que solamente se encuentran presentes en cepas de aislados nosocomiales y ausentes en aislados ambientales, de los cuales 38 de ellos se ha reportado que juegan algún papel involucrado en virulencia. En general los aislados clínicos presentan mayor cantidad de genes relacionados a factores de virulencia, en especial los asociados al moviloma. Al identificar que cada especie cuenta con un set de genes en particular y exclusivo de los aislados clínicos, nos da indicios para argumentar que las especies de *Acinetobacter* utilizan estrategias diferentes para establecerse en los ambientes hospitalarios.

En el caso de las especies de *Acinetobacter*, no se encontró alguna relación proporcional evidente entre el número de fagos y secuencias CRISPR/Cas presentes en el genoma con respecto a tener una mayor resistencia a los antibióticos.

Sin importar el hábitat donde se aislaron, las 52 cepas analizadas de *Acinetobacter* presentan genes asociados a factores de virulencia identificados en *A. baumannii*, lo que indica la existencia de un core de genes intrínseco a las especies que favorece su persistencia en fómites, en las infecciones hospitalarias de pacientes inmunodeprimidos y su establecimiento en los nosocomios.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Infecciones hospitalarias

En las últimas décadas, el control de las infecciones adquiridas en los hospitales causadas por bacterias, se convirtió en un problema mundial. Por definición, se considera una infección hospitalaria o nosocomial (del griego “*nosos*” que significa enfermedad y “*komeion*” que significa cuidar) cuando el paciente recién ingresado al centro de salud no presenta síntomas o signos de la enfermedad, pero en un lapso de 48 a 72 horas adquiere una infección (Garner *et al.*, 1988).

En el año 2017, la OMS (Organización Mundial de la Salud) publicó una lista de patógenos prioritarios para promover su investigación y así desarrollar nuevos tratamientos para combatirlos. La lista consiste de 12 bacterias y la encabeza un grupo de 6 patógenos responsables de la mayoría de infecciones nosocomiales en todo el mundo: los patógenos “**ESKAPE**” (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y especies de *Enterobacter*). Desde el año 2008, se implementó el acrónimo de organismos ESKAPE debido a la gran capacidad que tienen de “escapar” a los efectos letales de los antibióticos (Rice, 2008). Recientemente, la IDSA (Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas) realizó un “llamado de acción a la comunidad médica” para alertar de la situación crítica que se vive en los hospitales con respecto a la problemática que representa este grupo de bacterias, señalando que los programas de control, prevención y vigilancia son ineficientes (Spellberg *et al.*, 2007). Por estas razones, es de suma importancia médica profundizar nuestros conocimientos sobre los mecanismos de virulencia, de resistencia a los antibióticos, de patogenicidad y de transmisión de estos organismos, ya que estos esfuerzos nos permitirán desarrollar nuevas opciones terapéuticas (Pendleton *et al.*, 2013).

1.2 Resistencia a antibióticos

Por muchos años nuestra defensa más poderosa para combatir las infecciones bacterianas han sido los **antibióticos**. Estos compuestos, naturales o sintéticos, de bajo peso molecular e inhibidores del crecimiento bacteriano, se utilizaron por primera vez en la década de los 40'. Sin embargo, el mal uso de estas sustancias ha dado pie a que las bacterias sean inmunes a ellos. La **resistencia** a los antibióticos es la capacidad que tienen las bacterias para sobrevivir en la presencia de estos fármacos y que les representa una ventaja para expandir su nicho ecológico y posibilita su proliferación ya sea en los nosocomios o en el ambiente (Garza-Ramos *et al.*, 2009). Actualmente, la resistencia bacteriana a los antibióticos se considera un problema de salud pública a nivel mundial ya que es causante de índices elevados de mortalidad hospitalaria. Desafortunadamente, en la medida que se utilizan diferentes antibióticos, se seleccionan bacterias resistentes a ellos, lo que trae como consecuencia que las opciones terapéuticas se acorten, que las infecciones persistan en el paciente y que se incremente el riesgo de su propagación.

Existen diferentes conceptos para describir los patrones de resistencias a los antibióticos de las bacterias que representan un problema de salud pública. Se definen como bacterias **multi-drogo resistentes (MDR)** aquellas bacterias que pueden resistir al menos 1 agente dentro de 3 o más categorías de antimicrobianos, los más comunes son los aminoglucósidos, las penicilinas, los carbapenémicos, las cefalosporinas y las quinolonas. Se consideran bacterias **extremo-drogo resistente (EDR)** cuando todavía son susceptibles a 1 o 2 categorías de antimicrobianos, en todas las demás categorías son resistentes al menos a un agente dentro de cada uno. Por último, se consideran organismos **pan-drogo resistentes (PDR)** aquellos que son resistentes a todas las clases de antibióticos existentes comercialmente (Magiorakos *et al.*, 2011).

Todas las bacterias tienen una colección o repertorio de genes que contribuyen a un fenotipo característico de resistencia a los antibióticos, al cual se le conoce como **resistoma** (D'Costa *et al.*, 2006) y determina 3 tipos de resistencia: fenotípica, intrínseca o adquirida (Figura 1). La **resistencia intrínseca** es el mecanismo de defensa

que se desarrolla de forma natural en la célula sin la exposición previa a los antibióticos, es una condición universal en las especies bacterianas y principalmente es consecuencia de mutaciones que dan como resultado una baja permeabilidad de la envoltura celular, la modificación enzimática de los antibióticos, la actividad de bombas de extrusión, la falta de un blanco apropiado para la droga y elementos involucrados en el metabolismo general de la bacteria (Olivares *et al.*, 2013). Por otra parte, la **resistencia adquirida** se caracteriza por la adquisición de genes, mediante eventos de transferencia horizontal, que protegen a la bacteria ante una variedad de antibióticos y les brinda la capacidad de adaptarse a diferentes ambientes (Di Pierro, 2015).

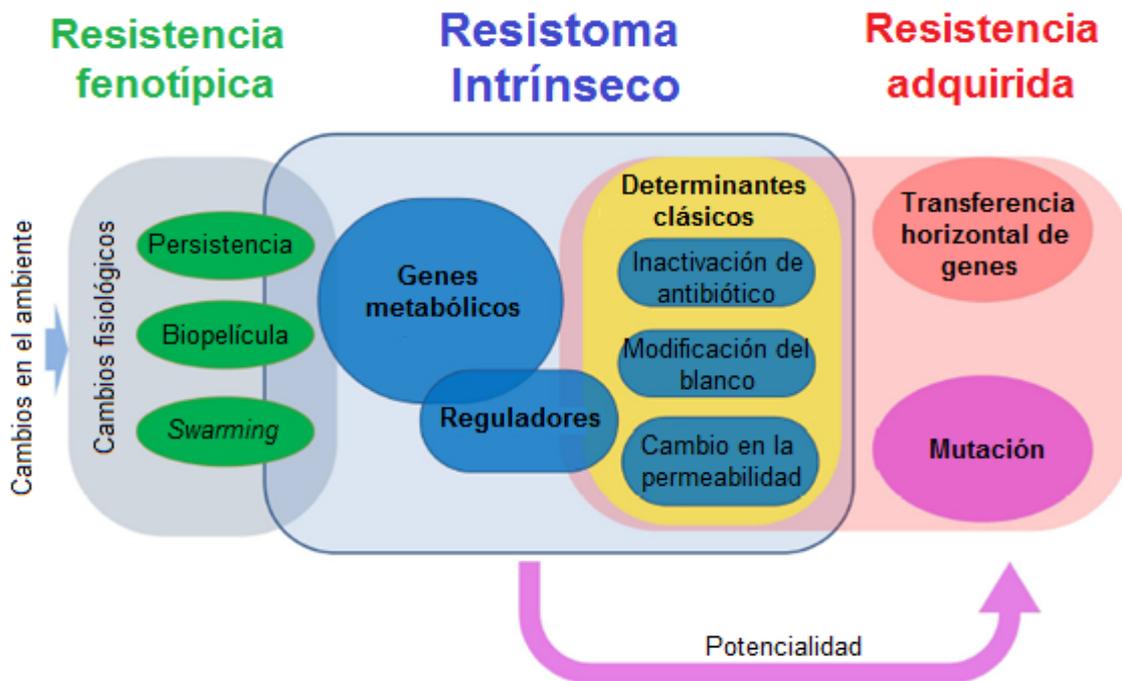


Figura 1. Los diferentes elementos en la resistencia bacteriana a los antibióticos.

Todas las bacterias tienen un repertorio de moléculas que contribuyen a su fenotipo característico de susceptibilidad a los antibióticos (**resistoma intrínseco**). Algunos de estos elementos son factores clásicos de resistencia, como enzimas que inactivan a los antibióticos, mientras que otros elementos pertenecen a todas las categorías funcionales. Las mutaciones de alguno de estos componentes hacen que la bacteria sea más susceptible a los antibióticos, mientras que para otras bacterias el incremento a la resistencia es **adquirido**. Sin embargo, la adquisición de un fenotipo resistente no siempre implica un cambio genético, se puede lograr mediante la **resistencia fenotípica**, la cual incluye diferentes procesos como el crecimiento de biopelícula, adaptación por “*swarming*” y el desarrollo de persistencia (variaciones fenotípicas que presentan un incremento en la resistencia a los antibióticos y son genéticamente idénticos a la cepa silvestre.) (Modificado de Olivares *et al.*, 2013).

Una vez que el microorganismo adquiere inmunidad a los antibióticos, el gen o genes responsables de la resistencia se pueden transferir a otros microorganismos por medio de plásmidos y transposones. Los eventos genéticos involucrados en la transferencia horizontal de elementos genéticos móviles (Figura 2) incluyen:

1) **Conjugación bacteriana:**

Es un proceso conservado universalmente entre los procariotas en donde se lleva a cabo la transferencia unidireccional de información genética de una bacteria donadora (macho) a una receptora (hembra) por contacto directo de célula a célula. En bacterias Gram-negativas, este proceso requiere de la formación de un *pilus* en la célula donadora, el cual se ensambla por un sistema de secreción tipo IV (T4SS), llamado **transferosoma**. Este complejo expande la membrana de la célula y está involucrado en la formación y retracción del *pilus*, así como en la identificación de una célula receptora adecuada y en la emisión de señales (De la Cruz *et al.*, 2009).

2) **Transformación bacteriana:**

La transformación permite la adquisición y la incorporación de ADN exógeno que se encuentre libre en el medio por las células bacterianas, las cuales tienen la capacidad de integrarlo en su genoma y expresarlo. Este mecanismo de transferencia horizontal de genes (HGT) fue el primero que se describió, y es un proceso regulado por proteínas codificadas en el cromosoma (Frost *et al.*, 2005).

3) **Transformación mediada por vesículas de membrana externa:**

Aparte de la transferencia vía conjugación y transformación, existe otro modo de transmisión de resistencia en bacterias Gram-negativas, el cual se lleva a cabo por vesículas de la membrana externa (OMVs) (Klimentov & Stulík, 2015). La secreción de OMVs es un fenómeno común durante el crecimiento de la bacteria, en donde la membrana externa y el periplasma son liberados naturalmente en forma de vesículas esféricas de bicapa lipídica. Las OMVs se consideran parte de un sistema de secreción que permite la diseminación a larga distancia de diferentes proteínas bacterianas y ADN en el ambiente; promueven la interacción con otras células eliminando la necesidad de un contacto directo entre bacterias. Las vesículas de la membrana

externa pueden contener lipopolisacáridos, fosfolípidos y elementos genéticos (ADN y RNA) (Chatterjee *et al.*, 2017).

4) Transducción:

La transducción es el mecanismo en el cual un fragmento de ADN se transfiere de una célula a otra mediante la participación de un virus (bacteriófago). Algunos bacteriófagos tienen la capacidad de incorporar su ADN al cromosoma de la célula hospedera, de forma que los nuevos genes introducidos, como los causantes de la resistencia a los antibióticos, se replican junto con el ADN bacteriano (Stearns & Hoekstra, 2005).

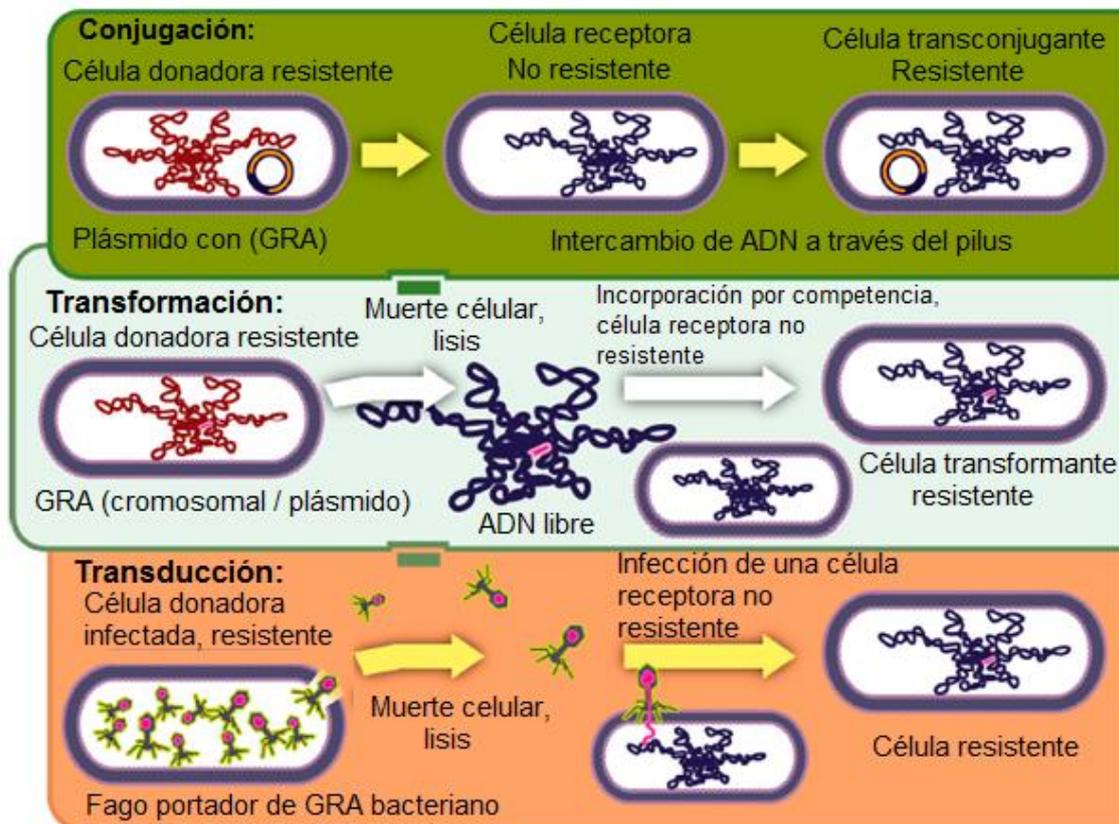


Figura 2. Transferencia horizontal de genes.

Los eventos de HGT ocurren comúnmente a través de la conjugación y la transformación. Adicionalmente, se puede llevar a cabo mediante la transducción, en donde la resistencia es transmitida por un bacteriófago. GRA = Gen de resistencia a antibiótico (Modificado de Schroeder *et al.*, 2017).

1.3 Elementos genéticos móviles (MGEs)

Los genes de resistencia a los diferentes antimicrobianos frecuentemente se encuentran en elementos genéticos móviles como los transposones, los integrones, los profagos, las secuencias de inserción y los elementos conjugativos e integrativos (ICEs) (Ochman *et al.*, 2000). Al conjunto de estos elementos genéticos especializados en mover ADN dentro y entre genomas y los genes que contienen, se les conoce colectivamente como **moviloma** (Siefert, 2009). El moviloma desempeña una gran función al generar una gran diversidad en los genomas bacterianos; fomenta los eventos de recombinación entre varios elementos móviles, los cuales adquieren a su vez más componentes incrementando su complejidad y resistencia (Garriss *et al.*, 2009). Los elementos genéticos móviles se pueden dividir en dos grupos: se definen como MGE intercelulares aquellos elementos que se transfieren de célula a célula, como los plásmidos, mientras que los MGE intracelulares no pueden transferirse por sí solos, para lograrlo requieren integrarse en los miembros intercelulares del primer grupo (Siguier *et al.*, 2013). A continuación, se describen brevemente los elementos genéticos móviles (Figura 3):

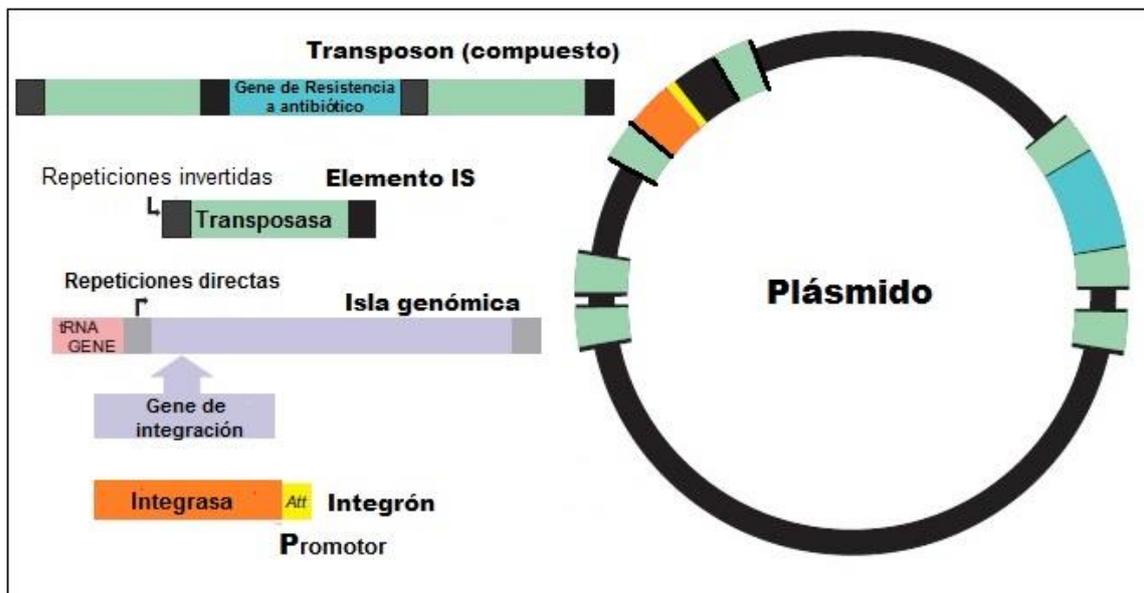


Figura 3. Variedad de elementos genéticos móviles en procariontas.

Los elementos genéticos móviles (MGEs) se refieren a cualquier segmento de ADN que tiene la capacidad de moverse dentro de una misma célula o entre diferentes células. Los MGEs incluyen: Secuencias de inserción (IS), que son elementos que contienen un gen que codifica para una transposasa flanqueado por repeticiones invertidas. Transposones que incluyen tanto

elementos IS como transposones compuestos. Islas genómicas (GIs) que contienen genes de movilidad o conjugación las cuales codifican para una integrasa o transposasa. Integrones compuestos por un gen *Int I*, un sitio de recombinación *attI* y un promotor. Plásmidos, los cuales son moléculas circulares o lineales de ADN que se replican de manera independiente al cromosoma de la célula hospedera (Modificado de Nayoung, 2011).

1.3.1 Plásmidos: Las bacterias pueden contar con moléculas de ADN extracromosomal denominadas plásmidos (Figura 4), los cuales no son necesarios para la viabilidad general, pero pueden contener genes que contribuyen a su supervivencia en condiciones ambientales específicas, como pudiera ser la presencia de antibióticos. Generalmente los plásmidos son moléculas circulares o lineales, de tamaño variado, que tienen la habilidad de replicarse de manera independiente del ADN cromosómico y de transferirse a otras bacterias mediante transformación o conjugación bacteriana (Miljkovic-Selimovic *et al.*, 2007).



Figura 4. Estructura de un plásmido. Los módulos pueden dividirse en 4 partes; Replicación y control (replicón básico), estabilidad y mantenimiento (genes de segregación y partición), transferencia y propagación (origen de transferencia, *oriT*) y el módulo accesorio (resistencia a antibióticos).

1.3.2 Transposones: Un transposón es una secuencia de ADN que puede moverse dentro del mismo genoma, intra- o inter-replicones gracias a la acción de la *transposasa*, proteína encargada de la transposición e integración. Debido a la capacidad que tienen de “brincar” a diferentes locaciones se les nombró en un principio como “genes saltarines”. Los transposones se encuentran en todos los organismos y se consideran elementos claves en la evolución del genoma al ser una fuente de variación genética y mutaciones. Se pueden clasificar de acuerdo a su contenido génico como **transposones simples, secuencias de inserción o elementos**

de inserción (IS), si en su estructura contienen el gen que codifica para la transposasa flanqueado por secuencias repetidas invertidas, mientras que los **transposones compuestos** se encuentran flanqueados por elementos de inserción y tienen en su estructura central la *transposasa* y genes que proveen alguna ventaja selectiva a las bacterias que lo adquieren, como la resistencia a antibióticos (Salyers *et al.*, 1995). De acuerdo a la estrategia de transposición existen los **transposones de clase I**, también llamados retrotransposones, los cuales para movilizarse necesitan que se sintetice un RNA intermediario. Estos elementos se retrotranscriben a ADN complementario mediante la actividad de la transcriptasa reversa y se insertan en otra posición del genoma. Los **transposones de clase II** se mueven de un lugar a otro mediante un mecanismo de “cortar y pegar” y no requieren la síntesis de un intermediario de ARN. Por último, los transposones se pueden clasificar mediante el mecanismo de transposición. Se le denomina **replicativo**, si se genera una copia del elemento durante la transposición, una de ellas se inserta en un sitio nuevo mientras que la otra permanece en el sitio original. En el mecanismo **conservativo**, el elemento no se replica y simplemente se escinde del cromosoma o plásmido y se integra en un nuevo sitio.

1.3.3 Secuencias de inserción (IS): Los elementos de inserción se encuentran entre los elementos genéticos móviles más simples y se encuentran distribuidos en todos los dominios de la vida. Estos compactos y pequeños elementos (entre 0.8 y 2.5 kb) tienen la capacidad de moverse por sí mismos dentro del genoma o entre genomas (de manera horizontal) como parte de otros vectores como fagos y plásmidos. Las secuencias de inserción generalmente se encuentran flanqueadas por repeticiones invertidas cortas y contienen un gen que codifica para una transposasa, la cual cataliza el corte y la unión del ADN que ocurre en los sitios de reconocimiento y de transposición (Mahiillon *et al.*, 1999). Estos elementos transponibles autónomos tienen un impacto importante en la evolución y la plasticidad del genoma hospedero; la consecuencia directa de una transposición IS es la inserción de una secuencia de ADN en otra, teniendo como resultado la modulación de la expresión o inclusive la inactivación de genes. Si existen múltiples copias idénticas de elementos IS dispersos en el genoma se pueden promover arreglos genómicos como inversiones, deleciones

y duplicaciones, lo que conlleva a cambios fenotípicos que pueden influir en la resistencia a antibióticos, virulencia, patogenicidad y el catabolismo de la bacteria (Vandecraen *et al.*, 2017).

1.3.4 Integrones: Los integrones son sistemas genéticos muy versátiles de adquisición de genes, los cuales han moldeado la respuesta adaptativa de las bacterias al generar diversidad fenotípica. Este sistema desempeña un papel importante en la adquisición, expresión y diseminación de genes de resistencia a los antibióticos, particularmente entre patógenos Gram-negativos (Gillings, 2014). Los integrones están compuestos de 3 elementos principales: un gen *Int1*, que codifica para una integrasa que cataliza la incorporación o escisión de casetes que adquieren genes por recombinación sitio-específico, un sitio de recombinación *attI* y un promotor responsable de la expresión de los genes insertados en el casete (Hall & Collis, 2006). En la actualidad se han descrito hasta 9 tipos de integrones, que se distinguen por la secuencia de la integrasa que codifican, la forma de capturar genes y la resistencia que proporcionan, sin embargo, los integrones más comunes y estudiados pertenecen al tipo I, los cuales están presentes y se identifican en aislamientos clínicos (Figura 5).

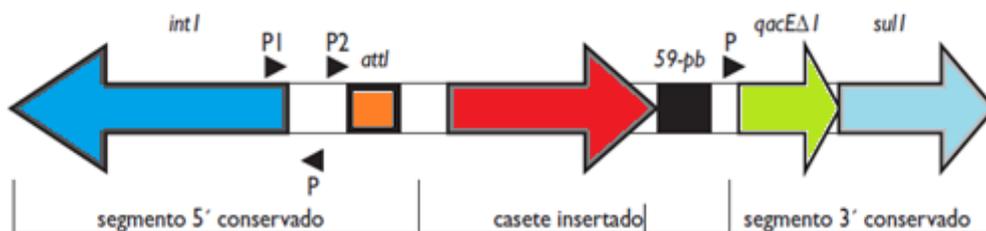


Figura 5. Estructura general de los integrones de clase 1. Están constituidos por una región variable (casete) flanqueada por regiones conservadas, denominadas 5'CS y 3'SC. En la región 5'CS se localiza el gen de la integrasa, *int1*, la región de recombinación *att1* y los promotores (P), indicados por las flechas menores. P1 y P2 permiten la transcripción de los genes que ingresan en la región variable. En la región 3'CS se hallan los genes de resistencia a antisépticos y desinfectantes *qacEΔ1*, un gen de resistencia a sulfonamidas *sul1*. El casete del gen integrado se muestra en relación con el elemento de recombinación denominado 59-pb, que se recombina con el elemento *att1* para la incorporación del casete que contiene gen de resistencia (Garza-Ramos & Silva-Sanchez, 2009).

La movilización de los casetes se lleva a cabo por la acción de la integrasa, la cual genera numerosas reconfiguraciones y combinaciones de casetes, de tal manera que es posible acumular varios casetes con diferentes resistencias en una misma

estructura, lo que permite la transmisión de diversos genes al mismo tiempo y se pueden diseminar mediante transposones o plásmidos, generando como consecuencia cepas MDR. Los integrones son una plataforma estable de reclutamiento de genes, pero son inmóviles y necesitan estar asociados a un elemento genético móvil para la transmisión y diseminación a otros microorganismos.

1.3.5 Elementos conjugativos e integrativos (ICEs): Los ICEs son elementos conjugativos auto-transferibles presentes tanto en bacterias Gram positivas como en Gram negativas. Estos elementos se encuentran integrados en el cromosoma, pero retienen la habilidad de escindirse, formar un intermediario circular covalentemente cerrado y de transferirse a otra célula bacteriana, en la cual generalmente se insertan en el cromosoma. Los ICEs promueven su propia movilización y contribuyen a la transferencia horizontal de factores de virulencia, los genes de resistencia a los antibióticos o genes asociados a otros fenotipos.

La estructura que tienen es similar a otros tipos de elementos móviles, tienen un esqueleto compuesto de 3 módulos genéticos: el módulo de integración y escisión, que es el responsable del mantenimiento del elemento por la acción de la integrasa; el módulo de conjugación, que codifica para la maquinaria necesaria para su diseminación y, por último, el módulo de regulación de la expresión de genes para su posterior transferencia. Este esqueleto puede adquirir funciones adicionales por la acción de secuencias de inserción, transposones y recombinasas específicas (Burrus & Waldor, 2004; Bi *et.al*, 2014).

Las **islas genómicas** ("*Genomic Islands, GI*") pertenecen a este tipo de elementos y se definen como regiones cromosomales lineales (10-200 kb) que forman parte del "pool" de genes flexible que portan uno o más genes que codifican factores que aumentan la adaptabilidad, versatilidad y competencia de un microorganismo dentro de un nicho, incorporando adaptaciones importantes ambientales o de interés clínico. Las islas genómicas se pueden identificar por estadísticas nucleotídicas, como el contenido de GC que usualmente difiere del resto del cromosoma, generalmente se insertan en genes de tRNA y se encuentran flanqueadas por repeticiones directas de 16 a 20 pb. Entre los genes que contiene suelen encontrarse integrasas, proteínas relacionadas

con el sistema de conjugación o proteínas de fagos, todas ellas implicadas de algún modo en la transferencia de la isla genómica. También pueden incluir transposones o secuencias de inserción implicados en la movilización de ciertos genes, los cuales modifican la información presente en dicha isla. De acuerdo al contenido génico y la ventaja adaptativa que confieren a las cepas que las albergan, se pueden clasificar en islas de patogenicidad, de simbiosis, metabólicas e islas de resistencias a los antibióticos (Juhas *et al.*, 2009).

1.4 Características del género *Acinetobacter*

El primer aislamiento obtenido de *Acinetobacter* (del griego “akinetos” que significa no móvil) se obtuvo del suelo y se identificó como *Micrococcus calcoaceticus* por el microbiólogo neerlandés Beijerinck en 1911. Posteriormente, hubo mucha controversia al momento de clasificar esta cepa y se ha incorporado, a lo largo del tiempo, en diferentes géneros. No fue sino hasta 1954 cuando Brisou y Prévot propusieron el género *Acinetobacter* para separar los miembros no móviles de los organismos móviles del género *Achromobacter* (Brisou & Prévot, 1954) y años más tarde, en 1968 Baumann continuó con la caracterización de este género implementando diferentes medios selectivos y pruebas bioquímicas (Baumann *et al.*, 1968). El género *Acinetobacter* se describió e ingresó al sistema oficial de taxonomía al publicarse en la “Lista aprobada de nombres de bacterias” (Skerman *et al.*, 1980) y en el “Manual de Bergey de bacteriología sistemática” (Juni, 1984) en el año 1984. En la actualidad la clasificación taxonómica de este género es la siguiente: Familia Moraxellaceae, Orden Pseudomonadales, Clase Gamma Proteobacteria y filo Proteobacteria, el más grande y diverso del dominio *Bacteria*.

Las especies de *Acinetobacter* son bacterias Gram-negativas, no-móviles pero algunas cepas presentan motilidad por “*twitching*” asociada con la presencia de fimbrias polares. Tienen un contenido de G+C entre 39% y 47% en el ADN (Howard *et al.*, 2012), son estrictamente aerobias, oxidasa, nitrato e indol negativas y catalasa positiva. Carecen de pigmentación y crecen fácilmente en la mayoría de medios comúnmente utilizados en aislamientos microbiológicos a una temperatura óptima para la mayoría

de aislados clínicos entre 33° y 37°C (Vallenet *et al.*, 2008). Estas bacterias tienen forma de cocobacilos y en ocasiones forman cadenas de longitud variable. Se distribuyen ampliamente en la naturaleza en donde el agua y el suelo son sus principales nichos ecológicos. Los *Acinetobacter* se han encontrado en diferentes fuentes ambientales como áreas contaminadas con hidrocarburos, sedimentos fangosos, drenajes y basureros. También se han podido aislar en animales y vegetales y como comensales en la piel, la garganta y en distintas secreciones de los humanos (Atrouni *et al.*, 2016).

Las especies del género *Acinetobacter* se encuentran implicadas en una variedad de infecciones nosocomiales incluyendo a las bacteremias (diseminación por el torrente sanguíneo), la meningitis (inflamación de las meninges), las infecciones de heridas y del tracto urinario, pero el más frecuente de todas es la neumonía asociada a respiradores (Bergogne-Bérézin & Towner, 1999). Actualmente, la mayoría de las infecciones provocadas por *Acinetobacter* involucran cepas multidrogo-resistentes que afectan a pacientes severamente enfermos o debilitados que se encuentran internados, por periodos largos, en las unidades de cuidados intensivos (UCI). Las manos del personal médico pueden ser colonizadas con algunas especies de *Acinetobacter*, lo que facilita su propagación en los pacientes. Las especies patógenas de este género no solo afectan a los pacientes en hospitales; se han reportado también infecciones en individuos sanos de varias edades en comunidades pequeñas, heridos en zonas de guerra o después de un desastre natural (Tayabali *et al.*, 2012).

Los plásmidos identificados en las cepas de *Acinetobacter* varían considerablemente tanto en tamaño (2.1 hasta >100 kb) como en número (1-7 plásmidos). De igual forma se han identificado cepas que no presentan plásmidos. El análisis de perfiles de plásmidos ha sido muy útil para describir y definir brotes de infecciones causadas por *Acinetobacter* en ambientes hospitalarios (Bergogne-Bérézin & Towner, 1999).

Con el advenimiento de las estrategias de secuenciación masiva es cada vez más frecuente ubicar bacterias taxonómicamente utilizando datos de la secuencia del genoma completo (Jung & Park, 2015). Con estos métodos, se han identificado nuevas

especies del género *Acinetobacter* y el género ahora contiene 53 especies con nombres validados y publicados (Atrouni *et al.*, 2016).

1.5 *Acinetobacter baumannii* (Complejo *calcoaceticus-baumannii*)

Desde que en 1986 se estableciera una nueva taxonomía para el género *Acinetobacter*, *A. baumannii* se ha convertido en el representante más importante del género por ser un formidable patógeno nosocomial (Figura 6), de difícil control y tratamiento, y que ha alcanzado en poco tiempo una amplia distribución, generando problemas a nivel mundial (Peleg *et al.*, 2008). En la actualidad, es un miembro del grupo “ESKAPE” y comenzó a reconocerse como patógeno relevante asociado a hospitales a partir de 1970. En un principio estas cepas eran sensibles básicamente a todos los antibióticos, pero rápidamente empezaron a incorporar genes de resistencia y hoy en día, encontramos cepas que son resistentes a todos los antibióticos comercialmente disponibles (PDR). De hecho, la OMS la considera como la especie más peligrosa del género *Acinetobacter* dado al rango de antibióticos al que ahora es resistente. (<http://www.sciencemaq.org/news/2017/02/meet-who-s-dirty-dozen-12-bacteria-which-new-drugs-are-most-urgently-needed>).



Figura 6: Cultivo y microscopía electrónica por barrido de *Acinetobacter baumannii*. (http://www.paho.org/els/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=1629&Itemid=324).

La tasa de mortalidad por las infecciones del tracto sanguíneo o por las neumonías asociadas a respiradores causadas por especies de *Acinetobacter* es del 30 % al 70%. *A. baumannii* tiene la tasa más alta de mortalidad y de incidencia en comparación con otras especies del género *Acinetobacter* (Clark *et al.*, 2016). En un estudio realizado en

el año 2014, se colectaron 2,337 muestras de *A. baumannii* de 453 hospitales de 48 países de todo el mundo. De manera global, la incidencia de organismos MDR de *A. baumannii* excede en un 75% en África, Asia y América latina, y en un 90% en partes de Europa y el medio oriente (Lob *et al.*, 2016), lo que limita las opciones terapéuticas y en caso de que las infecciones se lleven a cabo en pacientes inmunocomprometidos, la probabilidad de muerte aumenta.

Sólo un número muy limitado de clonas de *A. baumannii* son la causa predominante de brotes epidémicos. Estas clonas suelen ser MDR y se les ha designado como clonas internacionales I, II y III. Estas tres clonas se han diseminado en amplias áreas geográficas y han sido las causantes de brotes institucionales específicos. La clona más dominante y persistente con cepas de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos, es la clona internacional II aislada principalmente en hospitales de Europa (van Dessel *et al.*, 2004). El éxito de *A. baumannii* como patógeno nosocomial también se atribuye a ciertas capacidades como:

- **La habilidad de adherirse a superficies tanto bióticas como abióticas y la formación de biopelículas:** Tiene la habilidad de sobrevivir en superficies secas bajo condiciones limitadas de nutrientes hasta por 4 meses, lo que facilita su transmisión en ambientes naturales y médicos (Lee *et al.*, 2011). Su persistencia en los hospitales y la invasión a hospederos susceptibles se debe parcialmente a su habilidad de adherirse a los diferentes equipos médicos y a las células epiteliales. Estas capacidades dependen del factor de virulencia OmpA, proteína de membrana externa. La formación de biopelícula, constituida principalmente de *poly-β-1,6-N-acetylglucosamine* (PNAG), se encuentra bajo regulación del hospedero (condiciones de crecimiento - densidad celular), factores ambientales y mediante sistemas de percepción del quórum. *A. baumannii* tiene algunos genes de motilidad los cuales pueden ensamblar los *pili* y producir movimiento bajo ciertas condiciones, esto puede contribuir a la habilidad de propagarse en fómites y formar biopelícula (Mussi *et al.*, 2010).

- **Múltiples factores de virulencia facilitan infecciones en humanos:** El factor multifuncional OmpA es el mejor conocido; aparte de estar involucrado en la adhesión

y formación de biopelículas, contribuye a la invasión de células epiteliales y la inducción de apoptosis celular (Gaddy *et al.*, 2009). Al igual que otras bacterias Gram-negativas, el lípido A constituyente de los lipopolisacáridos (LPS) de *A. baumannii* induce una respuesta inflamatoria mediada por receptores Toll-like. Los factores de virulencia se excretan por medio de vesículas de membrana externa de la bacteria hacia el interior de células hospedadoras. Las vesículas contienen OmpA, LPS, material periplásmico y pueden transferir genes de resistencia a otra bacteria mediante este método (Rumbo *et al.*, 2011).

-Mecanismos de resistencia a una amplia variedad de antibióticos: Presentan la habilidad de adquirir material genético foráneo mediante la transferencia lateral de genes para poder sobrevivir a la presión de selección por antibióticos. La presencia innata de mecanismos de resistencia y la adquisición de grupos de genes exógenos para la resistencia (plásmidos, transposones, ICE e integrones) son la razón de la rápida generación de cepas MDR y EDR de *A. baumannii* a nivel mundial.

Desafortunadamente, ahora otras especies del mismo género como *A. calcoaceticus*, *A. pittii*, *A. seifertii*, *A. nosocomialis* y recientemente *A. dijkshoorniae* (Cosgaya *et al.*, 2016) están empezando a ser problemáticas en los hospitales. Debido a que estas 5 especies de interés clínico están muy relacionadas genómicamente con *A. baumannii* y son muy difíciles de distinguir entre ellas mediante propiedades fenotípicas. Se agrupan dentro de un mismo complejo llamado ACB (***Acinetobacter calcoaceticus* – *Acinetobacter baumannii***), el cual es responsable de la mayoría de las infecciones y brotes epidemiológicos hospitalarios en todo el mundo, cuando se tratan de infecciones por *Acinetobacter* (Nemec *et al.*, 2015). Las cepas pertenecientes al complejo ACB tienen un valor de identidad en la secuencia 16S rRNA entre el 97% y el 99.9% y valores interespecie entre el 65% y el 75% (Golanbar *et al.*, 2011). El hábitat natural y los mecanismos de patogénesis de la mayoría de estas especies no se conocen a fondo, esto se debe principalmente a que las técnicas fenotípicas que se utilizan son insuficientes, lo que no permite una precisa identificación, ni un poder discriminatorio fiable entre estas cepas relacionadas de *Acinetobacter*. La única

manera precisa para diferenciar a los 6 miembros del complejo ACB es por métodos moleculares.

Se ha demostrado que cepas que pertenecen al complejo ACB y a la clona Internacional II de *A. baumannii*, forman hasta 3 veces más biopelícula que otras especies de *Acinetobacter* cuando se crecieron en medio Mueller Hinton a 25°C por 48 horas (Martí *et al.*, 2011), la cual protege a la bacteria de la acción de los mecanismos de defensa del hospedero y la actividad antimicrobiana se reduce.

1.6 Dificultades en la identificación de especies y patógenos emergentes del género *Acinetobacter*.

Los métodos fenotípicos que se usan comúnmente en los hospitales son razonablemente buenos para identificar al género *Acinetobacter*, sin embargo, no pueden identificar correctamente a las diferentes especies del complejo *calcoacetico-baumannii* y a otras especies relacionadas con este complejo. Lo que nos lleva a preguntarnos ¿Qué tan bueno es agrupar diferentes especies en un mismo complejo? Esto clínicamente representa un problema porque no es posible diferenciar la biología y los mecanismos de patogénesis de las especies individuales. Por ejemplo *A. calcoaceticus* predomina como un aislado ambiental y a la fecha, no existen estudios de genómica comparativa en donde se contrasten con cepas hospitalarias y así, conocer los factores que favorecen su establecimiento en hospitales.

En contraste, existen métodos moleculares que nos proveen de una mejor resolución y poder discriminatorio para diferenciar especies muy cercanas y que nos permiten comprender mejor la epidemiología, el significado clínico y la identificación de especies de *Acinetobacter*. Durante más de 50 años la técnica taxonómica predilecta para diferenciar especies procariontas ha sido la hibridación DNA-DNA (DDH). Mediante este método se evalúa la similitud general del material hereditario y el porcentaje de similitud estándar para considerar que dos cepas pertenecen a la misma especie es de un 70 % como mínimo (Tindall *et al.* 2010). Sin embargo, los valores DDH son difíciles de reproducir y debido a que pueden variar entre laboratorios es difícil comparar y compartir la información. Por otra parte, los avances tecnológicos y el bajo costo que

implica la secuenciación de genomas bacterianos, han ocasionado que el número de genomas disponibles aumenten, generando nuevas oportunidades de evaluar las relaciones taxonómicas, descubrir nuevas taxa y la posibilidad de poder compartir los resultados en una base de datos.

Como consecuencia, se han desarrollado nuevas herramientas bioinformáticas para comparar los datos genómicos, como la **identidad nucleotídica promedio (ANI)**, que es una de las medidas más robustas para comparar la relación genómica entre cepas. Tiene un potencial enorme en la taxonomía de bacterias ya que se ha utilizado ampliamente como un sustituto de la intensa y laboriosa técnica DDH para diferenciar especies (Goris *et al.*, 2007). ANI representa un valor de identidad/similitud entre regiones homólogas compartidas por dos genomas; un valor mayor al 95% equivale a un valor del 70% de hibridación DNA-DNA y puede ser utilizado como límite para la diferenciación entre especies (Richter & Rossello, 2009).

La **secuenciación** es una herramienta fundamental en la era genómica, su función permite determinar la secuencia de todo el genoma de nuevas especies, determinar el genoma de un individuo dentro de una población, secuenciar moléculas de RNA de una muestra en particular y utilizar secuencias de ADN para diferentes técnicas y estudios dentro de la biología molecular (Zerbino & Birney, 2008). Los **secuenciadores de última generación (NGS)** implementan la tecnología de secuenciación del ADN que ha revolucionado la investigación genómica, la cual a pesar de superar la secuenciación convencional de Sanger, se ha implementado poco en las prácticas rutinarias clínicas debido a los altos costos de los equipos y el personal capacitado. Existen diferentes plataformas de NGS que utilizan diferentes tecnologías de secuenciación, sin embargo, todas ellas tienen la capacidad de secuenciar millones de pequeños fragmentos de ADN en paralelo, en donde cada base del genoma es secuenciada múltiples veces para tener lecturas profundas y obtener secuencias más precisas. Por ejemplo, **Illumina** domina la industria de secuenciación de lecturas cortas debido a la amplia variedad y compatibilidad de plataformas disponibles, las cuales pueden generar una precisa y completa caracterización de cualquier especie. Sin embargo, algunos genomas son altamente complejos y contienen varios elementos largos repetitivos y variaciones estructurales relevantes para la evolución y adaptación

del microorganismo, los cuales generalmente son tan largos que las tecnologías de lecturas pareadas cortas son insuficientes para resolverlos. La tecnología de secuenciación de lecturas largas permite la resolución de los elementos complejos o regiones repetidas, abarcándolas con una única lectura continua eliminando la ambigüedad de la posición o tamaño de los elementos genómicos (Goodwin *et al.*, 2016). Pacific BioSciences (**PacBio**) y Oxford Nanopore Technologies (**ONT**) son quizás los más utilizados e importantes dentro de la secuenciación masiva de tercera generación. Estas tecnologías son una excelente herramienta para obtener genomas completos o cerrados debido a que tienen la mejor tecnología para generar lecturas de tamaños muy largos (Rhoads & Au, 2015). Por último, se utilizan programas bioinformáticos para ensamblar todos los fragmentos obtenidos en un proceso que se conoce como ensamblaje de *nov*o, en donde se utiliza la identidad entre secuencias de ADN para conectar fragmentos individuales en secuencias contiguas más largas, denominados *contigs* (secuencia consenso obtenida a partir del ensamblaje de las lecturas “*reads*”). Como alternativa se puede mapear las lecturas individuales contra un genoma de referencia.

Una utilidad importante de los NGS aplicada a la microbiología es la sustitución de la caracterización convencional de los patógenos a través de su morfología, propiedades de tinción y criterios metabólicos, con una definición genómica de los patógenos bacterianos. El genoma de los patógenos es lo que los define, contiene información acerca de la sensibilidad a drogas y nos permite conocer la relación que tienen diferentes patógenos entre sí, y puede ser utilizado para rastrear la fuente de brotes de infección (Behjati & Tarpey, 2013). Sin duda, los NGS facilitan y potencializan el descubrimiento de factores de virulencia a través de estudios de genómica comparativa entre bacterias y permiten realizar investigaciones epidemiológicas de brotes de enfermedades recientes (Chen *et al.*, 2012).

Debido a la implementación de nuevas tecnologías en los laboratorios de diagnósticos clínicos, recientemente se han identificado otras especies de *Acinetobacter* causantes de infecciones en pacientes inmunodeprimidos. Estas nuevas especies usualmente son clasificadas erróneamente como *A. baumannii*, por ello se desconocen su virulencia, su

patogenicidad y su real impacto en la salud humana. Se desconoce también si en unos años estos microorganismos se convertirán en un problema de salud pública a nivel global. Las infecciones asociadas a hospitales causadas por otros miembros del género *Acinetobacter* como lo son: *A. bereziniae*, *A. guillouiae*, *A. haemolyticus*, *A. johnsonii*, *A. junii*, *A. lwoffii*, *A. parvus*, *A. radioresistens*, *A. schindleri*, *A. soli* y *A. ursingii* son raras y se restringen principalmente a infecciones del torrente sanguíneo relacionadas al uso de catéter. Generalmente son más susceptibles a agentes antimicrobianos y usualmente son considerados organismos con virulencia y niveles de mortandad bajos (Dijkshoorn *et al.*, 2007).

1.7 Herramientas de vigilancia epidemiológicas

Debido a que en las últimas décadas los brotes por especies de *Acinetobacter* han tenido un incremento considerable en todo el mundo, es necesario disponer de métodos eficientes de tipificación epidemiológica. En un inicio se utilizaban métodos fenotípicos, pero a la fecha, han sido remplazados por métodos moleculares. La selección de métodos genotípicos depende mucho del objetivo del estudio, y pueden ayudar a responder preguntas como saber si es un brote mono o policlonal, si son cepas introducidas recientemente o son endémicas de un hospital, diferenciar aislados esporádicos de aquellos epidémicos y conocer si los patrones de transmisión se llevan a cabo entre pacientes o el personal médico. Dentro de los métodos de tipificación molecular más utilizados que permiten la caracterización epidemiológica de brotes de *Acinetobacter* se encuentran: el análisis de restricción del fragmento amplificado del gen ribosomal 16S rRNA (16S-ARDRA), el análisis de polimorfismos de fragmentos de amplificación (AFLP), la ribotipificación, la electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE), la secuenciación del genoma completo (WGS) y la secuenciación del gen de la subunidad β de la RNA polimerasa, *rpoB*.

La **Ribotipificación** es una técnica basada en una hibridación “*Southern blotting*”, en donde se analizan los polimorfismos dentro de las secuencias codificantes de los genes ribosomales 16S y 23S. En esta técnica el ADN genómico bacteriano se digiere con enzimas de restricción, los fragmentos de restricción se separan por electroforesis y se transfieren a una membrana. La hibridación se lleva a cabo

utilizando una sonda específicamente para el ADN ribosomal y no se requiere utilizar radioactividad en este proceso. Las enzimas de restricción más comunes para identificar especies de *Acinetobacter* son *Clal*, *Sall*, *HindIII*, *EcoRI* y los perfiles que se obtienen pueden ser especie o cepa específicos (Gerner-Smidt, 1992).

Hoy en día, la ribotipificación se ha sustituido por el método de **electroforesis de campos pulsados (PFGE)**, el cual es considerado el método predilecto para el estudio epidemiológico de *A. baumannii*. En este caso, primeramente, el ADN genómico se digiere con enzimas de restricción de corte poco frecuente. Posteriormente, los fragmentos de restricción resultantes se separan por electroforesis de campos pulsados, llamada así porque los impulsos eléctricos durante la electroforesis cambian de dirección, frecuencia e intensidad. Para la tipificación de especies de *Acinetobacter* las enzimas de restricción más utilizadas son *Apal* y *SmaI*. Para predecir la similitud entre clonas de *A. baumannii* el criterio más común utilizado es que compartan un número de fragmentos >80% (4 a 6 diferencias en el gel con un promedio de 20 bandas por patrón). Las desventajas que tiene esta técnica son varias: primero, es una técnica que requiere más de 5 días para obtener resultados. Segundo, el equipo y reactivos que se requieren para su realización son muy costosos y, por último, es muy difícil contrastar resultados entre laboratorios (Ahmed & Alp, 2015).

Existen genes candidatos para la tipificación basados en la amplificación y la secuenciación de un solo gen (SLST, “*single locus sequence typing*”), los cuales pueden utilizarse en países en desarrollo debido a que es económico, rápido y poco laborioso. La amplificación y la secuenciación del gen **16S ribosomal** es el método más común utilizado para la identificación bacteriana. El gen es universal en las bacterias, tiene una longitud de 1,150 pb, está compuesto de regiones variables y conservadas y tiene 94% de similitud entre especies de *Acinetobacter*. Se han realizado análisis de restricción de las secuencias espaciadoras intergénicas 16S-23S ribosomales para la diferenciación de especies pertenecientes al complejo ACB, argumentando que las secuencias espaciadoras intergénicas tienen un bajo grado de variación intraespecie y un alto grado de divergencia interespecie (Dolzani *et al.*, 1995). Sin embargo, el gen 16S ribosomal no es lo suficientemente polimórfico para diferenciar claramente todas

las especies de *Acinetobacter*, debido a su extremadamente baja tasa de sustitución de bases.

Por otra parte, el **gen *rpoB*** que codifica para la subunidad beta de la RNA polimerasa, ha demostrado tener un mejor poder discriminatorio que el gen 16S y es confiable para realizar estudios filogenéticos, clasificación taxonómica y de esta manera, poder delimitar especies estrechamente relacionadas. El gen *rpoB* tiene una longitud de 4,089 pb y se identificaron 4 regiones variables, 2 regiones se encuentran dentro del gen *rpoB* (la zona 1 tiene un tamaño de 350 pb y la zona 2 de 450 pb) y 2 regiones se encuentran en los extremos del gen (*rplL-rpoB* y *rpoB-rpoC*), las cuales tienen el suficiente polimorfismo para una rápida identificación de la mayoría de especies de *Acinetobacter* (La Scola *et al.*, 2006).

Recientemente se propuso utilizar el **gen *adeB*** para realizar estudios epidemiológicos de *Acinetobacter*, este gen forma parte de un grupo de genes que codifican para un sistema de extrusión AdeABC que confiere a la bacteria resistencia a tetraciclina y aminoglucósidos, pero se conoce poco sobre la distribución del gen en cepas no relacionadas y de diferentes zonas geográficas en todo el mundo. De hecho, gracias a la disponibilidad de genomas secuenciados en bases de datos, se demostró que el operón AdeABC no está presente en todas las cepas MDR de *A. baumannii* y no se logró identificar en algunas cepas ambientales (Huys *et al.*, 2005).

El **gen cromosomal *bla_{OXA-51}*** se ha utilizado para la identificación molecular a nivel de especie de *A. baumannii*, es un buen candidato debido a que esta β -lactamasa es originalmente intrínseca y, por tanto, ubicua para esta especie. Sin embargo, en estudios recientes se ha identificado la presencia de *bla_{OXA-51}* en plásmidos de otras especies de *Acinetobacter* como *A. nosocomialis* y una geno especie cercana "13 TU" posiblemente vía transposición (Lee *et al.*, 2011); inclusive se ha identificado en especies de Enterobacteriaceae (Leski *et al.*, 2013), lo que afecta la precisión al utilizar este gen como una herramienta para diferenciar *A. baumannii* de otras especies de *Acinetobacter*.

La tipificación basada en **secuencias multilocus (MLST)** es una de las técnicas más exitosas y relativamente nueva diseñada para el estudio de estructuras poblacionales de patógenos bacterianos. El MLST evalúa las mutaciones consideradas neutrales que se acumulan lentamente dentro de una población mediante la amplificación de 7 fragmentos internos de genes “housekeeping” involucrados en procesos metabólicos esenciales. Cada aislado se caracteriza por los alelos de cada uno de los 7 genes de la maquinaria basal, los cuales se secuencian y comparan. Cada secuencia distinta de cada uno de los genes del esquema se considera como un alelo tipo y se le asigna un número específico. La combinación de estos números alélicos o perfil alélico de la cepa aislada, define una secuencia tipo (ST) (Rafei *et al.*, 2014).

Para *A. baumannii* se han desarrollado dos esquemas de MLST. El primero de ellos es el esquema Oxford, introducido por Bartual y colaboradores (Bartual *et al.*, 2005), en donde se analizan secuencias conservadas de los genes: *gltA*, *gyrB*, *gdhB*, *recA*, *cpn60*, *gpi* y *rpoD*. El segundo esquema es el Pasteur, propuesto por Diancourt y colaboradores, desarrollado en el Instituto Pasteur (Nemec *et al.*, 2008). En este esquema se incluyen los genes: *cpn60*, *fusA*, *gltA*, *pyrG*, *recA*, *rplB* y *rpoB*. Ambos esquemas comparten solamente 3 genes (*cpn60*, *gltA* y *recA*). La ventaja de los esquemas de MLST, es que tienen un gran poder de resolución para delimitar linajes y permiten conocer las principales clonas que se están propagando. Además, esta técnica es perfectamente reproducible y la información se comparte en internet en la página <https://pubmlst.org/>. Estas características hacen de los esquemas de MLST la técnica por excelencia para la investigación de estructuras poblacionales y se utiliza como alternativa de la técnica PFGE.

¿Pero por qué basarse en la tipificación de ciertos genes cuando se puede obtener la información de todo el genoma mediante la **secuenciación del genoma completo (WGS)**? Gracias a los avances en la tecnología de la secuenciación, genomas completos y genomas en borrador (“draft”) de cepas de *Acinetobacter* están disponibles al público en bases datos. A diferencia de los métodos tradicionales de tipificación, la secuenciación de todo el genoma ayuda a descifrar la información total presente en el genoma bacteriano. Es una herramienta muy útil para realizar estudios epidemiológicos locales y globales, filogenéticos y de estructura de poblaciones

bacterianas, puede detectar diferencias genéticas en cepas estrechamente relacionadas y puede ayudar a esclarecer la ruta de transmisión que se lleva a cabo entre pacientes de un hospital. Los estudios del genoma bacteriano completo nos proveen de información importante para poder estudiar los brotes nosocomiales en hospitales y comprender mejor la evolución de un patógeno, lo cual puede contribuir a mejorar los diagnósticos, tratamientos y los sistemas de control y prevención de infecciones (Rafei *et al.*, 2014).

A pesar de los avances en el desarrollo de métodos genotípicos para la identificación de especies de *Acinetobacter*, éstos no se han utilizado extensamente en los hospitales.

1.8 Pregunta de investigación

- ¿Las cepas de *Acinetobacter* persisten en el ambiente hospitalario porque contienen un set específico de genes que los hace proclives a vivir en este medio o poseen un conjunto de mutaciones que los favorece a sobrevivir en este nicho?
- ¿Las especies de *Acinetobacter* tienen la misma estrategia para persistir en los hospitales o son estrategias especie-específicas?

2. ANTECEDENTES

2.1 El concepto de pangenoma

El concepto de pangenoma (“pan” significa “todo” en griego) se propuso por primera vez en el año 2005 por Tettelin, y se define como el repertorio completo de genes de una especie (Tettelin *et al.*, 2005). Una especie bacteriana se puede describir por su pangenoma, el cual está dividido en tres grupos: El **genoma core** está conformado por genes compartidos en todas las cepas del estudio, representa la esencia de la especie, codifica funciones relacionadas a la biología básica y otorga el fenotipo característico. El **genoma accesorio**, el cual representa la diversidad de las especies, contiene genes

presentes en dos o más cepas del estudio y probablemente codifican funciones no esenciales para el crecimiento de la bacteria, pero les confiere alguna ventaja selectiva como la adaptación a diferentes nichos, resistencia a antibióticos y la colonización de nuevos hospederos. El tercer grupo son los **genes únicos**, los cuales solamente están presentes en un genoma (cepa – aislado específico) (Medini *et al.*, 2005).

Los análisis pangenómicos nos proporcionan bases para determinar la diversidad genómica de diferentes especies, las cuales se caracterizan por tener un pangenoma **abierto** si el número de genes del pangenoma se incrementa al adicionar genomas secuenciados. Es característico de las especies que poseen un **pangenoma abierto** poder colonizar múltiples ambientes y tener diversas maneras de intercambiar material genético, por lo cual continuamente se extiende el set total de genes. Por otro lado, existen especies con un **pangenoma cerrado**, los cuales son más conservados y viven en nichos aislados con un acceso limitado a la reserva genética global microbiana) (Medini *et al.*, 2005). Por tal motivo, si se adicionan genomas no se identificarán nuevos genes y el pangenoma no se expandirá, debido a que con un pequeño número de genomas su repertorio genético ya se encuentra caracterizado (Vernikos *et al.*, 2015).

2.2 Resistencia a los antibióticos

Los carbapenémicos son los medicamentos más efectivos utilizados para combatir las infecciones causadas por las bacterias Gram-negativas MDR, sin embargo, su utilización está amenazada por cepas emergentes capaces de producir carbapenemasas, las cuales son enzimas β -lactamasas que pueden hidrolizar carbapenémicos, penicilinas y cefalosporinas e inhibir su función. En el año 2008 se describió una metalo- β -lactamasa llamada Nueva Delhi Metalobetalactamasa-1 (NDM-1), la cual se identificó por primera vez en un plásmido de *Klebsiella pneumoniae*. El gen *bla_{NDM-1}*, que confiere resistencia a diversos carbapenémicos, usualmente se encuentra flanqueado por elementos genéticos móviles, lo cual ha provocado su diseminación en todo el mundo y a solo 10 años de su descubrimiento, cada vez es más frecuente su identificación tanto en *Enterobacteriaceae* como en especies de

Acinetobacter en casi todos los continentes (Dortet *et al.*, 2014). El incremento a la resistencia a carbapenémicos es alarmante y genera mucha preocupación, hoy en día estamos presenciando la diseminación global de enzimas NDM en diferentes especies de *Acinetobacter* (Fu *et al.*, 2015). Desde el primer reporte en el año 2011 de bla_{NDM-1} positivo en *A. baumannii* de un aislado clínico, se han identificado en otras especies de *Acinetobacter* como lo son: *A. lwoffii* recuperado de comida de origen animal (Wang *et al.*, 2011), *A. pittii* aislado de una unidad de cuidados intensivos (Yang *et al.*, 2012), *A. johnsonii* recuperado del drenaje de un hospital (Zong & Zhang, 2013), *A. calcoaceticus* obtenido de un paciente con neumonía y fallas respiratorias (Li *et al.*, 2015), lo que confirma que NDM-1 se transfiere muy fácilmente a otras bacterias mediante transferencia horizontal de genes.

A. baumannii tiene características extraordinarias para sobrevivir como el desarrollo de resistencia a antibióticos, la habilidad de soportar la desecación y resistir a la mayoría de desinfectantes. Esto aunado a la habilidad de formación de biopelícula, provee a cepas hospitalarias la armadura fisiológica para lidiar con y sobrevivir por periodos largos en ambientes hospitalarios. La plasticidad genética intrínseca debe ser un factor clave en la rápida adaptación necesaria para sobrevivir a los ambientes hostiles en los hospitales (Peleg *et al.*, 2008).

Debido a que una de las principales preocupaciones con respecto a las cepas epidémicas de *A. baumannii* es la velocidad con que adquiere resistencias a diversos antibióticos, la mayoría de los análisis de comparación de secuencias de genomas completos de patógenos nosocomiales de cepas de *Acinetobacter*, se enfocan en la evaluación de la resistencia antimicrobiana, dejando a un lado las especies que no pertenecen al complejo ACB y como consecuencia, existen pocos estudios disponibles sobre las características de virulencia que establezcan a estos organismos como potenciales patógenos emergentes en hospitales.

Mediante un análisis de todo el genoma completo (WGS) se puede explorar y definir el conjunto de genes *core* y accesorio en genomas bacterianos. Con esta herramienta es posible realizar estudios de genómica comparativa entre bacterias patógenas y elucidar los genes involucrados en la resistencia a los antibióticos, factores de

virulencia, determinar el moviloma y realizar estudios epidemiológicos (Di Nocera *et al.*, 2011).

En este estudio se realizó una comparación genómica de 52 cepas pertenecientes a 5 especies del género *Acinetobacter* de aislados clínicos y ambientales. Se determinó el pangenoma y se identificaron aquellos genes que solo están presentes en el ambiente hospitalario y la función que llevan a cabo con el fin de elucidar cuáles pudieran ser las características que convierten a un agente infeccioso oportunista en uno persistente en los hospitales. A la fecha no se tiene conocimiento de si las cepas nosocomiales han adquirido genes que les permitan adaptarse y sobrevivir en ambientes hospitalarios o si son genes intrínsecos de la especie. Para eliminar las infecciones causadas por *Acinetobacter* se requiere un profundo conocimiento de los factores que permiten a estos patógenos persistir en ambientes hospitalarios, los genes necesarios para establecer una infección y aquellos involucrados en la resistencia a antibióticos.

3. HIPÓTESIS

Si las cepas de aislamientos clínicos de *Acinetobacter* presentan un set de genes en común que les brinda una ventaja para persistir en ambientes hospitalarios, entonces al comparar los genomas con aislamientos ambientales de *Acinetobacter* se lograrán identificar dichos genes.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo principal.

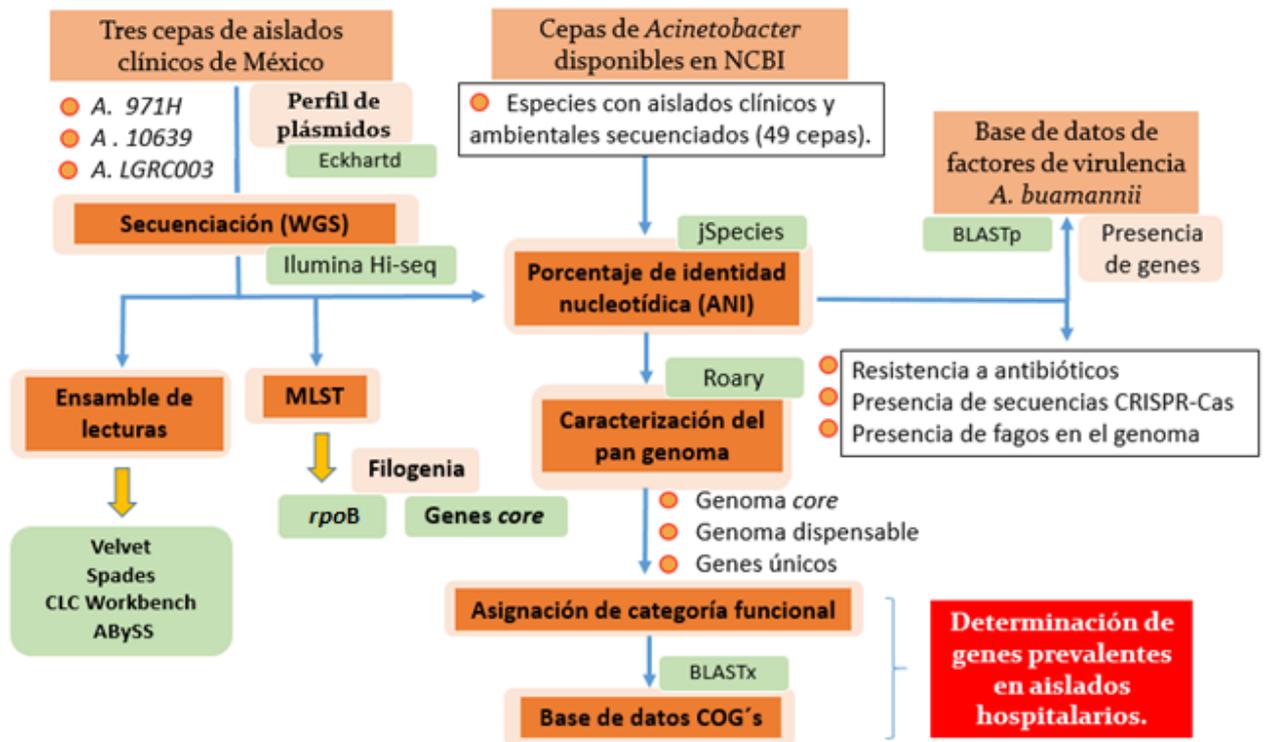
Identificación de los genes presentes únicamente en aislados clínicos y ausentes en aislados ambientales de cepas de *Acinetobacter* que se encuentran en hospitales.

4.2 Objetivos particulares.

1. Verificar una adecuada clasificación taxonómica de las cepas de *A. calcoaceticus*, *A. johnsonii*, *A. junii*, *A. soli* y *A. radioresistens* utilizadas en el estudio.
2. Identificar el pangenoma, el genoma *core* y el genoma accesorio de las especies de nuestro interés.
3. Identificar aquellos genes que se encuentran exclusivamente en las cepas aisladas de los ambientes hospitalarios.
4. Analizar el genoma *core* y determinar si las mutaciones en estos genes les favorecen para persistir en los hospitales.
5. Identificar si los genomas de las cepas hospitalarias presentan menos sistemas de CRISPR/Cas que sus contrapartes ambientales.
6. Identificar si las cepas hospitalarias presentan más genes de resistencia a los antibióticos que las cepas ambientales.
7. Crear una base de datos de genes relacionados a factores de virulencia de *A. baumannii* y comprobar si están presentes o ausentes en los 52 genomas utilizados en este estudio.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Diagrama del desarrollo experimental



5.2 Cepas bacterianas y medios de cultivo

Las cepas utilizadas en este trabajo se enlistan en la tabla 1. Las cepas de *Acinetobacter* (*A. 971H*, *A. LGRC003*, *A. 10639*) se crecieron a 37°C en medio de cultivo Luria-Bertani (LB) con una agitación de 250 rpm. Los datos de secuenciación y ensamblado de las cepas utilizadas en el estudio se enlistan en la tabla 2.

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en este estudio. Las secuencias disponibles de *Acinetobacter* se descargaron de NCBI vía ftp para realizar estudios de comparación genómica. Las cepas de aislados clínicos se indican en rojo y las cepas de aislados ambientales en color verde.

Cepa <i>Acinetobacter</i>	Fecha de colección	Zona geográfica	Hospedero	Fuente de aislamiento
<i>sol</i> NIPH 2899	2005	República Checa: Praga	<i>Homo sapiens</i>	Esputo (flema)
<i>sol</i> TCM341	Oct-2012	China	<i>Homo sapiens</i>	Esputo de paciente con hemorragia cerebral

<i>solii</i> ABBL054	22-Mar-08	USA: Chicago	<i>Homo sapiens</i>	Bacteremia, sangre
<i>solii</i> 971H	2016	México	<i>Homo sapiens</i>	-
<i>solii</i> CIP110264	2007	Korea del Sur: Mt. Baekwoon	-	Tierra del bosque
<i>solii</i> KCTC22184	-	Korea del Sur: Gwangyang, Mt. Baekwoon	-	Bosque
<i>solii</i> GFJ2	2011	Thailandia	-	Suelo / tierra
<i>junii</i> SH205	-	-	<i>Homo sapiens</i> (perineo)	Piel, heces
<i>junii</i> NIPH182	1993	República Checa: Praga	<i>Homo sapiens</i>	Pus, inflamación
<i>junii</i> CIP64.5	-	-	<i>Homo sapiens</i>	Urinario
<i>junii</i> TG19608	-	-	<i>Homo sapiens</i>	Urinario
<i>junii</i> NBRC110497	-	Japón, Tokio	<i>Homo sapiens</i>	Esputo (flema)
<i>junii</i> NBRC109759	-	-	<i>Homo sapiens</i>	Urinario
<i>junii</i> LRGC003	2016	México	<i>Homo sapiens</i>	Úlcera variciosa
<i>junii</i> 10639	2016	México	<i>Homo sapiens</i>	-
<i>junii</i> KCTC 12416	-	Australia	-	Planta tratadora de aguas residuales
<i>junii</i> CIP 107470	1991	Australia, Bendigo, Victoria	<i>Homo sapiens</i>	Planta tratadora
<i>junii</i> MTCC 11364	-	Australia, Victoria	-	Planta tratadora de aguas residuales
<i>junii</i> L20	Apr-2014	Malasia	Agua	Agua de lago
<i>junii</i> 65	1991	Rusia, región Novosibirsk	Agua	Agua limnética
<i>calcoaceticus</i> RUH2202	-	-	<i>Homo sapiens</i>	Piel
<i>calcoaceticus</i> NIPH13	-	-	<i>Homo sapiens</i>	-
<i>calcoaceticus</i> ANC3680	2008	Republica Checa, Rampu	Suelo / tierra	Bosque
<i>calcoaceticus</i> CIP81.1	1900/1910	Holanda, Delft	Suelo / tierra	Suelo / tierra
<i>calcoaceticus</i> ANC3811	2009	República Checa	Agua	Agua
<i>calcoaceticus</i> TG19593	-	-	-	Suelo / tierra
<i>calcoaceticus</i> TG19585	-	-	-	Suelo / tierra
<i>calcoaceticus</i> TG19588	-	-	-	-
<i>calcoaceticus</i> P23	2008	Japón, Hokkaido, Sappo	Lemna aoukikusa	Agua de estanque
<i>calcoaceticus</i> KCTC2357	-	-	-	Suelo / tierra
<i>calcoaceticus</i> GK1	2009	Bélgica, Genk	Populus	Rizosfera contaminada con diesel
<i>calcoaceticus</i> GK2	24/10/09	Bélgica, Genk	Rizosfera de árbol Poplar	Rizosfera
<i>calcoaceticus</i> CA16	30-Jul-15	Canadá, London, Ontario	Raíces de canola	Suelo / tierra
<i>johnsonii</i> XBB1	2012-01-01	China, Chengdu	-	Agua residual de hospital

<i>johnsonii</i> SH046	-	-	<i>Homo sapiens</i>	Piel
<i>johnsonii</i> CIP 64.6	-	-	<i>Homo sapiens</i>	Duodeno
<i>johnsonii</i> Aj2199	2014	Argentina, Buenos Aires	<i>Homo sapiens</i>	Fluido peritoneal (infección)
<i>johnsonii</i> TG19605	-	-	<i>Homo sapiens</i>	Duodeno
<i>johnsonii</i> TG19625	-	-	-	Superficie hospitalaria
<i>johnsonii</i> WJ10621	-	-	<i>Homo sapiens</i>	Infección nosocomial
<i>johnsonii</i> DSMZ 6963	-	-	<i>Homo sapiens</i>	Duodeno
<i>johnsonii</i> MB44	Dec-2006	China, Wuhan	<i>Populus lasiocarpa</i>	-
<i>johnsonii</i> ANC3681	2008	Republica Checa, Rampuse	-	Agua
<i>radioresistens</i> TG02010	-	-	<i>Homo sapiens</i>	Sangre
<i>radioresistens</i> SH164	-	-	<i>Homo sapiens</i>	Tracto gastrointestinal
<i>radioresistens</i> NIPH2130	-	-	<i>Homo sapiens</i>	Urinario
<i>radioresistens</i> SK82	-	-	<i>Homo sapiens</i>	Piel
<i>radioresistens</i> WC-A-157	11-Feb-08	Irak, Camp Delta	<i>Homo sapiens</i>	Piel, neumonía
<i>radioresistens</i> CIP103788	01/01/88	Japón	<i>Homo sapiens</i>	Tampones de algodón, infección nosocomial
<i>radioresistens</i> NBRC102413	-	-	<i>Homo sapiens</i>	-
<i>radioresistens</i> SA188	01-Mar-14	Arabia Saudita, Jiza	<i>Indigofera</i> sp.	Raíces
<i>radioresistens</i> CM38	20-Dec-13	France, Paris	<i>Mus musculus</i>	Intestino

Tabla 2. Datos de secuenciación y ensamblado de las cepas utilizadas en el estudio.

Cepa <i>Acinetobacter</i>	Tecnología de secuenciación / Ensamblador	# de Contigs	N50	Tamaño (pb)	Secuencia de referencia (NCBI)
<i>sol</i> i NIPH 2899	Illumina / allpaths v. R43241	13	1,156,709	3,463,506	NZ_KB849643.1
<i>sol</i> i TCM341	Illumina HiSeq / Velvet v. 1.0.19	74	151,748	3,498,148	NZ_JAPY010000 21.1
<i>sol</i> i ABBL054	Illumina HiSeq / Ray v. 1.7	127	70,480	3,439,483	NZ_LLEZ010001 20.1
<i>sol</i> i 971H	Illumina HiSeq / Velvet	192	33,828	3,377,254	Este trabajo
<i>sol</i> i CIP110264	Illumina / allpaths v. R43241	17	379,012	3,359,986	NZ_KB849636.1
<i>sol</i> i KCTC22184	Illumina MiSeq /	33	256,224	3,330,453	NZ_BBNM01000

	newbler v. 2.6				001.1
<i>solis</i> GFJ2	Illumina 454 / Newbler v. 2.8	8	3,438,298	3,636,349	NZ_CP016896.1
<i>junii</i> SH205	Illumina 454 / -	176	43,774	3,463,059	NZ_GG705011.1
<i>junii</i> NIPH182	Illumina / allpaths v. R43388	14	422,693	3,310,173	NZ_KB849648.1
<i>junii</i> CIP64.5	Illumina / allpaths v. R43241	41	139,333	3,357,744	NZ_KB849655.1
<i>junii</i> TG19608	Illumina GA-II / Velvet v. 1.1.0.4	136	51,258	3,257,504	NZ_AMJF01000 067.1
<i>junii</i> NBRC110497	Illumina HiSeq 1000 / newbler v. 2.6	168	44,776	3,597,040	NZ_BBOS01000 001.1
<i>junii</i> NBRC109759	Illumina HiSeq 1000 / newbler v. 2.7	108	55,221	3,226,826	NZ_BBSG01000 001.1
<i>junii</i> LRGC003	Illumina HiSeq / ABySS	215	56,070	3,628,182	Este trabajo
<i>junii</i> 10639	Illumina HiSeq / ABySS	242	28,090	3,765,676	Este trabajo
<i>junii</i> KCTC 12416	Illumina MiSeq / newbler v. 2.7	237	26,160	3,539,602	NZ_BBSD01000 001.1
<i>junii</i> CIP107470	Illumina / allpaths v. R43388	81	92,241	3,782,348	NZ_KB849609.1
<i>junii</i> MTCC11364	Illumina HiSeq / CLC NGS Cell v. wb 6	248	24,956	3,549,566	NZ_ASYZ010000 57.1
<i>junii</i> L20	Illumina HiSeq / CLC NGS Cell v. 7.0	144	59,330	3,199,812	NZ_JWJT010000 32.1
<i>junii</i> 65	PacBIO / HGAP3 v. September-2016	1	3,378,307	3,378,307	NZ_CP019041.1
<i>calcoaceticus</i> RUH2202	Illumina 454 / -	81	74,883	3,881,790	NZ_GG704949.1
<i>calcoaceticus</i> NIPH13	Illumina / allpaths v. R43933	11	591,150	3,928,504	NZ_KB849143.1
<i>calcoaceticus</i> ANC3680	Illumina / allpaths v. R43388	8	2,501,931	4,074,938	NZ_KB849752.1
<i>calcoaceticus</i> CIP81.1	Illumina / allpaths v. R43388	12	550,857	3,929,658	NZ_KB849780.1
<i>calcoaceticus</i> ANC3811	Illumina / allpaths v. R43241	14	583,988	3,827,685	NZ_KB976986.1
<i>calcoaceticus</i> TG19593	Illumina GA-II / Velvet v. 1.1.0.4	29	369,028	3,911,510	NZ_AMIY01000 002.1
<i>calcoaceticus</i> TG19585	Illumina GA-II / Velvet v. 1.1.0.5	34	370,458	3,810,905	NZ_AMIW01000 015.1
<i>calcoaceticus</i> TG19588	Illumina GA-II / Velvet v. 1.1.0.4	31	844,197	3,902,769	NZ_AMIX01000 002.1
<i>calcoaceticus</i> P23	Illumina Hiseq 1000 / Newbler v. 2.6	44	359,295	4,058,823	NZ_BBQU01000 002.1

<i>calcoaceticus</i> KCTC2357	Illumina MiSeq / newbler v. 2.6	18	367,132	3,893,207	NZ_BBTM01000001.1
<i>calcoaceticus</i> GK1	IonTorrent / SPAdes v. 3.1.0	35	228,328	3,943,681	NZ_JYGV01000008.1
<i>calcoaceticus</i> GK2	IonTorrent / SPAdes v. 3.1.0	28	316,549	3,742,642	NZ_LQMV010000025.1
<i>calcoaceticus</i> CA16	Illumina / Mauve v. 2.4.0; Seqman Pro v. Lasergene	2	4,110,074	4,115,994	NZ_CP020000.1
<i>johnsonii</i> XBB1	Illumina 454 / Newbler v. 2.6; Sspace v. 2.0	9	3,509,795	4,081,329	NZ_CP010350.1
<i>johnsonii</i> SH046	Illumina 454 / -	188	43,635	3,690,010	NZ_GG704964.1
<i>johnsonii</i> CIP 64.6	Illumina / allpaths v. R43933	48	124,388	3,608,403	NZ_KB849236.1
<i>johnsonii</i> Aj2199	Illumina HiSeq / spades v. 3.1	154	70,198	3,799,071	NZ_LVIB01000001.1
<i>johnsonii</i> TG19605	Illumina GA-II / Velvet v. 1.1.0.4	186	58,817	3,532,492	NZ_AMJD010000145.1
<i>johnsonii</i> TG19625	Illumina GA-II / Velvet v. 1.1.0.4	111	65,492	3,599,471	NZ_AMJE010000024.1
<i>johnsonii</i> WJ10621	Illumina GA / SOAPdenovo v. 1.03	8	592,437	3,184,320	NZ_CM001194.1
<i>johnsonii</i> DSMZ 6963	Illumina HiSeq 1000 /newbler v. 2.6	123	54,078	3,469,574	NZ_BBTB010000001.1
<i>johnsonii</i> MB44	Illumina / ABySS v. 1.3.7	75	106,230	3,357,599	NZ_LBMO010000054.1
<i>johnsonii</i> ANC3681	Illumina / allpaths v. R43388	11	425,187	3,540,498	NZ_KB849705.1
<i>radioresistens</i> TG02010	Illumina GA-II / Velvet v. 1.1.0.4	38	168,132	3,063,848	NZ_AMJJ010000003.1
<i>radioresistens</i> SH164	Illumina 454 / -	52	154,991	3,158,014	NZ_GG705131.1
<i>radioresistens</i> NIPH2130	Illumina / allpaths v. R43241	13	461,142	3,164,924	NZ_KB849733.1
<i>radioresistens</i> SK82	Illumina 454 / -	82	98,516	3,283,705	NZ_ACVR010000013.1
<i>radioresistens</i> WC-A-157	Illumina 454/ Celera Assembler v. 6.1	21	431,877	3,209,605	NZ_ALIR010000005.1
<i>Radioresistens</i> CIP103788	Illumina / allpaths v. R43388	23	462,527	3,195,486	NZ_KB849749.1
<i>A. radioresistens</i> NBRC102413	454 GS-FLX Titanium; Illumina HiSeq 1000 / Newbler v. 2.6	95	90,025	3,366,079	NZ_BAGY010000002.1
<i>radioresistens</i> SA188	Illumina MiSeq / SPAdes v. 3.6	37	289,666	3,202,805	NZ_LWGP010000001.1

radioresistens CM38	Illumina HiSeq / CLC NGS Cell v. 4.2.0	64	126,451	3,171,927	NZ_LATS010000 02.1
---------------------	--	----	---------	-----------	-----------------------

5.3 Obtención de muestras clínicas de diferentes hospitales de México

Se analizaron un total de 100 aislamientos clínicos de *Acinetobacter* provenientes de diferentes hospitales de México. En su mayoría estos aislamientos se recuperaron de infantes y pacientes adultos que se encontraban en la unidad de cuidados intensivos. En este estudio se analizaron aquellas cepas de *Acinetobacter* que no pertenecieran al complejo ABC.

5.4 Extracción de ADN genómico

Para purificar el DNA total de las cepas de interés clínico se utilizó el Kit de purificación de ADN Genómico de Thermo Scientific.

Las cepas se resembraron en cajas Petri con medio sólido LB (Luria Bertani) y se incubaron a 37 °C. De las colonias obtenidas se inoculó una colonia aislada en 2 ml de medio líquido LB. Posteriormente, se incubaron a 37°C durante toda la noche, y se recuperaron las células en tubos eppendorf obteniendo la pastilla mediante centrifugación a 14,000 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Se agregaron 200 µl de TE (pH 8) a cada muestra, posteriormente se agregaron 400 µl de solución de lisis. Se incubaron a 65°C durante 30 minutos, se agregaron 200 µl de cloroformo y se centrifugaron a 14,000 rpm durante 20 min. Se agregaron 720 µl de agua esterilizada y 80 µl de solución de precipitación, se centrifugó de 2 a 5 minutos y se removió completamente el sobrenadante. Se agregaron 100 µL de solución salina y se resuspendió. Se agregaron 3 µl de RNAsa y se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente, se agregaron 300 µl de etanol al 100% y se enfriaron en el congelador durante 10 minutos. Se centrifugaron durante 10 minutos a máxima revolución y se descartó el sobrenadante, recuperando la pastilla. Se agregaron 300 µl de etanol al 70% y se centrifugaron durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante completamente y después se incubaron a 37°C durante 3 minutos para evaporar el exceso de etanol. La pastilla obtenida se resuspendió en 100 µl de agua. Finalmente, las concentraciones de ADN se midieron en el NanoDrop y se corrió 1 µl de muestra de ADN en un gel de agarosa al 1% para corroborar que la muestra estuviera limpia de RNA.

5.5 Perfil de plásmidos (Eckhardt)

Para la visualización de los plásmidos que contienen las cepas de interés clínico del género *Acinetobacter*, se utilizó la técnica de Eckhardt (Eckhardt, 1978), que permite la

separación de plásmidos en geles de agarosa por medio de una lisis suave de las células, la cual se describe a continuación:

Las células se crecieron a 37 °C en 3 ml de medio LB hasta la fase exponencial. Se midió la densidad óptica del cultivo y se ajustó a 0.2. Se tomaron entre 250 µl y 450 µl (0.2 D.O.) de células y se centrifugaron durante 2 minutos a 14,000 rpm y se desechó el sobrenadante. La pastilla celular se resuspendió en 0.5 ml de agua fría estéril. Se adicionó 1 ml de *N*-Lauroyl Sarcosina al 0.3% (en TE 50/20 Mm pH 8.0) lentamente y las células se centrifugaron nuevamente durante 5 minutos a 14,000 rpm, el sobrenadante se retiró cuidadosamente con ayuda de una jeringa. La pastilla celular se resuspendió en 40 µl de ficoll al 20% (en TE 10/1). Se preparó con anterioridad la solución de lisis en alícuotas de 230 µl (RNAsa 0.4 mg/ml en TE + 1 mg/ml de azul de bromofenol) y se agregaron 40 µl de lisozima (10 mg/ml en H₂O). De la mezcla final se tomaron 20 µl que se agregaron a cada muestra.

El gel para la electroforesis se preparó con agarosa al 0.75% en Tris-Borato (TB) 1X y se montó en una cámara para electroforesis con buffer TB 1X. Posteriormente se colocaron 30 µl de SDS 10% - Xilencianol (1mg /ml) en cada pozo y se corrieron durante 15 minutos a 100 volts con los polos invertidos. Una vez finalizado el pre-corrido, se colocaron entre 10 y 15 µl de la muestra final en los pozos regresando los polos a su lugar correspondiente y se corrió a 100 volts durante 600 minutos en el cuarto frío. Al terminar la corrida, el gel se tiñó con una solución de Bromuro de etidio (1mg/ml) durante 20 minutos y después se lavó con agua destilada durante 15 minutos. El gel se observó en el transiluminador con luz UV permitiendo la visualización de los plásmidos y se tomó una foto con el sistema G-Box.

5.6 Amplificación de los genes *rpoB* y *16S*

Se utilizaron oligos específicos para amplificar regiones variables de los genes *rpoB* y *16S* rRNA con el fin de corroborar que pertenecen al género *Acinetobacter* (datos no mostrados). Se secuenció el gen *16S* rRNA de los aislados clínicos para determinar su porcentaje de similitud. Un porcentaje del 99% de identidad en la secuencia del gen *16S* de rRNA fue el criterio utilizado para identificar un aislado a nivel de especie. El criterio para identificar un organismo a nivel de género fue un porcentaje de similitud entre 97% y 99%.

5.7 Secuenciación del genoma completo (WGS)

Se utilizaron secuenciadores de última generación (NGS) HiSeq-Illumina para obtener el genoma completo de las cepas clínicas de *Acinetobacter*. Las secuencias se ensamblaron de *novo* utilizando los ensambladores **Velvet** (<http://www.ebi.ac.uk/~zerbino/velvet/>), **SPAdes** (*St. Petersburg genome assembler* - <http://bioinf.spbau.ru/en/spades>), **CLC Workbench** y **ABYSS** (*Assembly By Short Sequences* - <https://aprelum.com/abyssws/download.php>). Para realizar los análisis genómicos, se utilizó el servidor RAST (*Rapid Annotation using Subsystem Technology*, versión 2.0) para la anotación del genoma completo (Aziz *et al.*, 2008).

5.8 Caracterización del pangenoma y análisis filogenético

Todas las secuencias disponibles de las cepas de *A. junii*, *A. soli*, *A. johnsonii*, *A. radioresistens* y *A. calcoaceticus* se descargaron de NCBI vía ftp para realizar el estudio genómico comparativo. La anotación de los genomas se realizó utilizando PROKKA (<https://github.com/tseemann/prokka>). Para identificar el pangenoma, genes *core*, genes accesorios y únicos se utilizó Roary (<https://sanger-pathogens.github.io/Roary/>). Las figuras de mapas de calor del pangenomase generaron utilizando el paquete de R llamado “ComplexHeatmap”. Para la asignación en una categoría funcional general del pangenoma, la anotación COG (“*clusters of orthologous groups*”) se realizó utilizando el software BLASTx contra la base de datos COG (identidad 35 %, cobertura 75%).

Para el análisis filogenético se extrajo el gen *rpoB* de los 52 genomas utilizados en el estudio, se verificó que en todos los casos el gen estuviera completo y en la misma orientación. Los alineamientos de las secuencias de aminoácidos del gen *rpoB* se realizaron con Clustal Omega v1.2.0. Para determinar el mejor modelo evolutivo de sustitución de aminoácidos se utilizó ProtTest (<https://github.com/ddarriba/prottest3>), el archivo multi-FASTA con las secuencias de aminoácidos se convirtió en formato phylip para poder cargarlo en el servidor (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml>). El árbol filogenético se infirió utilizando PhyML (versión 3.0) bajo el modelo de aminoácidos LG y se utilizó la prueba *SH-like* por defecto para evaluar el soporte de las ramas del análisis.

Para el análisis filogenético de los genes *core* de los 52 genomas de *Acinetobacter*, se utilizó el archivo multi-FASTA del alineamiento de los genes *core* basado en los SNPs (“*Single Nucleotide Polymorphism*”) creado por Roary (<https://sanger-pathogens.github.io/Roary/>). Para determinar el mejor modelo evolutivo se utilizó jModelTest, el cual incluye el software PhyML versión 3.0 utilizado para estimar filogenias de máxima verosimilitud de alineamientos de secuencias de nucleótidos. El mejor modelo evolutivo para los genes *core* fue GTR+I+G, y realizamos 1000 réplicas de *bootstap* para evaluar la robustez de la filogenia. Para la visualización gráfica de los arboles filogenéticos se utilizó FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

5.9 Identificación de genes únicos hospitalarios y ambientales

Una vez determinado el pangenomade cada especie de *Acinetobacter*, utilizamos la matriz de presencia y ausencia de genes (presencia indicado con el número “1” y ausencia con el número “0”) generado por Roary para identificar aquellos genes presentes únicamente en aislados hospitalarios. Se modificó el orden de las cepas en la matriz de tal manera que se agruparan en aislados clínicos y aislados ambientales.

Posteriormente se desarrolló un script en Perl que nos permitiera identificar en la matriz, aquellos genes presentes únicamente en un grupo y que se excluyen en el otro (Anexo I).

A continuación, se muestra un ejemplo del script utilizado para una especie de *Acinetobacter* que cuenta con 7 cepas secuenciadas, 4 de ellas son hospitalarias y 3

son ambientales. El script identifica los genes que estén presentes en al menos el 50% del número de cepas de cada grupo, en este ejemplo de 4 cepas hospitalarias, identifica los genes hospitalarios de la siguiente manera:

- Presente en todos los aislados hospitalarios (4), ausente en todos los aislados ambientales (0).
- Presente en tres aislados hospitalarios (3), ausente en todos los aislados ambientales (0).
- Presente en dos aislados hospitalarios (2), ausente en todos los aislados ambientales (0).

Se realizó el mismo procedimiento para identificar los genes presentes únicamente en aislados ambientales, solo que a la inversa.

- Ausente en todos los aislados hospitalarios (0), presente en todos los aislados ambientales (3).
- Ausente en todos los aislados hospitalarios (0), presente en dos aislados hospitalarios (2).

El resultado es un listado con los nombres de los genes presentes únicamente en cepas hospitalarias y ambientales. Se identificaron los nombres en el archivo del pangenomay se extrajeron las secuencias de los genes en un formato multifasta. El script se debe de modificar dependiendo del número de cepas secuenciadas por especie y determinar cuántas de ellas son aislados hospitalarios y ambientales.

5.10 Identidad nucleotídica promedio (ANI)

Se calculó el promedio de identidad nucleotídica de las cepas de *Acinetobacter* y se utilizaron cepas del complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (*A. nosocomialis* 6411, *A. seifertii* NIPH973, *A. baumannii* ACICU, *A. pittii* AP882) para verificar el poder de resolución que tiene esta herramienta al agrupar correctamente las cepas por su relación genómica. El ANI se utilizó para delimitar especies utilizando datos de secuencias genómicas; se utilizó MUMmer (NUCmer) para alinear los genomas e identificar las regiones homólogas del genoma completo, cuando la identidad nucleotídica promedio tiene un valor igual o mayor al 95%, se considera que pertenecen a la misma especie.

5.11 Presencia de secuencias CRISPR, fagos y resistencia a antibióticos en genomas de aislados clínicos y ambientales de *Acinetobacter*

Se utilizó el programa **CRISPR Recognition Tool (CRT)** para identificar las secuencias palíndromas repetidas inter-espaciadas de cada genoma. Para la identificación y anotación de secuencias de profagos en genomas bacterianos y plásmidos se utilizó **PHASTER** (“**PHAGE** Search Tool Enhanced Release”, <http://phaster.ca/>).

Se utilizó el programa **ResFinder 2.1** (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) para identificar genes adquiridos de resistencia antimicrobiana.

5.12 Lista de genes de virulencia de *Acinetobacter baumannii*

Se recopilaron un total de 92 secuencias de genes reportados en artículos como factores asociados a virulencia en *A. baumannii*. Se realizó un BLASTp de los 52 genomas de *Acinetobacter* utilizados en este estudio contra nuestra base de datos de genes de virulencia (identidad 60 %, cobertura 80%). Los genes que cumplían con los porcentajes asignados se indicaban como presentes en el genoma, por otra parte, se asignaban como ausentes en el genoma si tenían valores menores a los porcentajes establecidos.

6. RESULTADOS

6.1 Secuenciación del genoma de tres aislados clínicos de *Acinetobacter* (no *baumannii*)

En nuestro laboratorio se analizaron aproximadamente 100 aislamientos clínicos de *Acinetobacter* provenientes principalmente de la unidad de cuidados intensivos de diferentes hospitales de México. Todas las muestras proporcionadas por los hospitales llegaron etiquetadas e identificadas como *Acinetobacter baumannii*, pero al realizar una tipificación más precisa mediante la amplificación del gen *rpoB*, nos dimos cuenta que en su mayoría tenían una identificación errónea a nivel de especie (datos no mostrados). Debido a que en México solamente existen reportes de infecciones nosocomiales de *A. baumannii*, seleccionamos aquellas cepas mexicanas que no pertenecieran al complejo ACB (*971H*, *LRGC003* y *10639*) para poder evaluar el potencial que tienen como patógenos nosocomiales.

Las muestras se enviaron a MacroGen (Korea) y al Instituto de Biotecnología IBT-UNAM (México) para realizar la secuenciación del genoma completo mediante HiSeq 2000 Illumina.

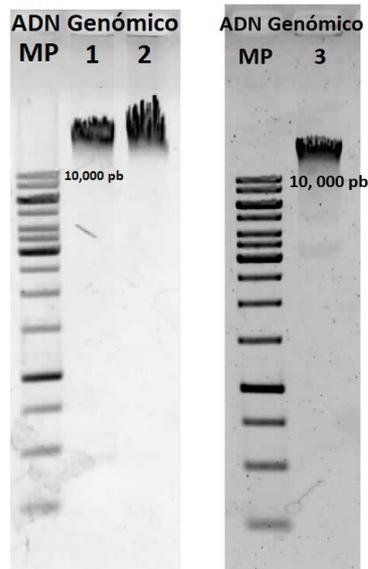


Figura 7. ADN total de las 3 muestras clínicas de *Acinetobacter*.

Una vez purificado el ADN genómico, se corrió 1 μ l de muestra de ADN total en un gel de agarosa al 1% para corroborar que las muestras estuvieran limpias de RNA y estuvieran en óptimas condiciones para secuenciar el genoma completo de los aislados clínicos (MP = Marcador de peso molecular "O'Gene Ruler 1 kb DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific". Carril 1 = A. 971H. Carril 2 = A. LRGC003. Carril 3 = A. 10639).

Una vez secuenciados los 3 genomas de interés clínico, el siguiente paso fue realizar el ensamblado de las lecturas. En el mejor de los panoramas, el objetivo del ensamblaje es obtener un número de fragmentos igual al número total de replicones en el genoma, en el caso de las bacterias un cromosoma y en ocasiones plásmidos. Para facilitar el ensamblaje es importante conocer el número de plásmidos que contiene cada cepa debido a que el número mínimo de *scaffolds* que se pueden obtener es igual a número de replicones que posee una cepa. Por otra parte, conocer el número de plásmidos de los aislados clínicos es relevante a nivel epidemiológico, ya que patrón o perfil de plásmidos se puede utilizar para identificar a las bacterias causantes de brotes epidémicos, ya sea a nivel local intrahospitalario o endémico de una región.

El número de plásmidos en las cepas de *Acinetobacter* es muy diverso, y en el caso de las cepas clínicas mexicanas no fue la excepción. Mediante un perfil de plásmidos (Eckhardt) identificamos que la cepa A. LRGC003 no contiene plásmidos mientras que la cepa A. 10639 tiene 1 plásmido de gran tamaño (aproximadamente 0.5 Mb) y la cepa A. 971H tiene 6 plásmidos de diversos tamaños (Figura 8). En la literatura se

menciona que los plásmidos pudieran conferir alguna ventaja selectiva a las bacterias para colonizar diferentes nichos y sobrevivir a condiciones específicas del ambiente. Sin embargo, muchos de los aislados clínicos de *Acinetobacter* poseen pocos plásmidos, e incluso en ocasiones ninguno, lo que pudiera indicar que la mayor parte de los genes que le permiten a esta bacteria sobrevivir en el ambiente hospitalario es de origen cromosomal.

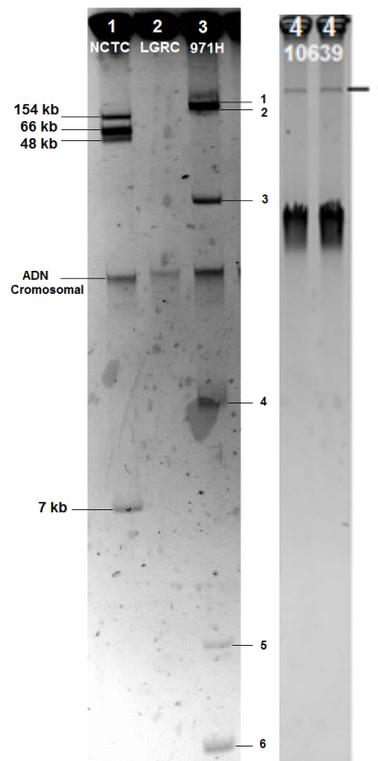


Figura 8. Perfil de plásmidos de las 3 cepas clínicas mexicanas de *Acinetobacter*.

Mediante la técnica de Eckhardt se determinó el número de plásmidos de los 3 aislados clínicos mexicanos. Carril 1 = *E. coli* NCTC 50192 (4 plásmidos). Carril 2 = *A. LRGC003* (no tiene plásmidos). Carril 3 = *A. 971H* (6 plásmidos de diversos tamaños). Carril 4 = *A. 10639* (1 plásmido de gran tamaño, aproximadamente de 0.5 Mb).

6.2 Ensamblado de secuencias *de novo*

Para realizar el ensamble de las secuencias del genoma completo se pueden utilizar dos estrategias, la primera consiste en disponer de un genoma completo que se utiliza como un mapa de referencia para guiar las secuencias que se desean ensamblar. Sin embargo, nosotros optamos por realizar ensambles *de novo*, procedimiento que no usa un genoma de referencia y utiliza solamente la información obtenida de la secuenciación para reconstruir todo el genoma, sin tener conocimiento *a priori* de la organización del mismo. Para esta tarea se utilizaron 4 ensambladores, sin embargo,

ABBySS y Velvet fueron los que dieron mejores resultados. Se seleccionó el mejor ensamble tomando como criterio tener el menor número de *contigs* posibles, con el mayor N50 y el mayor tamaño promedio de la longitud de los *contigs* (Tabla 3).

Tabla 3. Ensamble *de novo* de las cepas A. LRGC003, A. 971H y A. 10639.

El mejor ensamble se seleccionó y se anotó en la tabla. * Trimm = "Trimming".

Cepa de <i>Acinetobacter</i>	Ensambladores	Tamaño del K-mero	N50	Número de <i>contigs</i>	Promedio de longitud de <i>contigs</i>	Tamaño total (pb)
LRGC003	ABySS_Trimm	88	56070	125	28911	3613943
971H	Velvet_Trimm	81	33828	192	17547	3369135
10639	ABySS_Trimm	85	25577	256	13309	3407216

El tamaño promedio de los genomas de *Acinetobacter* es de 3.5 Mb, el cual es acorde con los tamaños obtenidos de nuestros 3 genomas de aislados clínicos.

Al momento de realizar un ensamble, lo ideal es obtener el menor número de *contigs* posibles, pero el mayor problema a resolver son las secuencias repetidas presentes en los genomas. Mediante la secuenciación de Illumina HiSeq se obtienen lecturas cortas que representan todo el genoma de la bacteria. Sin embargo, los genomas de *Acinetobacter* se caracterizan por poseer un alto número de secuencias repetidas y por ello, los genomas secuenciados únicamente con tecnología Illumina suelen quedar en muchos más *contigs* comparados con bacterias con genomas del mismo tamaño, pero con menor número de secuencias repetidas.

Como era de esperarse, los ensamblados de las 3 cepas clínicas mexicanas resultaron con un alto número de *contigs*. La única manera de mejorar estos ensamblados sería utilizar tecnologías de secuenciación como Pacific Biosciences (PacBio) o Minion (Oxford Nanopore), donde se obtienen lecturas de tamaños mucho más largos y que aumentan considerablemente la oportunidad de resolver la ubicación de las secuencias repetidas y con ello la calidad del ensamble.

6.3 Identificación a nivel de especie de los aislados clínicos mexicanos

A pesar de que la amplificación y la secuenciación del gen 16S ribosomal es el método más común utilizado para la identificación bacteriana, se ha demostrado que no es lo suficiente polimórfico para diferenciar claramente todas las especies de *Acinetobacter*. A la fecha se ha sustituido el gen 16S por el gen que codifica para la subunidad beta de la RNA polimerasa (*rpoB*), el cual tiene un mayor poder discriminatorio y es confiable para realizar filogenias y delimitar especies estrechamente relacionadas.

Por tal motivo, al tener las secuencias ensambladas de los 3 genomas, se identificó en qué *contig* se encuentra el gen ***rpoB*** de cada cepa y se extrajo la secuencia nucleotídica. Posteriormente se realizó un alineamiento BLASTx ("*National Center for Biotechnology Information*" – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para encontrar la similitud que tienen con secuencias pertenecientes a la familia *Moraxellaceae*.

Las tres secuencias de la proteína del gen *rpoB* (1,362 aminoácidos) tuvieron un 100% de identidad y de cobertura con el gen *rpoB* de alguna especie del género *Acinetobacter*. De esta manera se determinó que las cepas LRGC003 y 10639 pertenecen a la especie ***Acinetobacter junii***, mientras que la cepa 971H pertenece a ***A. soli***.

Gracias a los avances en las tecnologías de secuenciación, el número de secuencias disponibles de genomas bacterianos en bases de datos como NCBI, es cada vez mayor; situación que ha generado la necesidad de desarrollar nuevas herramientas bioinformáticas para poder analizar y comparar los datos genómicos entre especies. Una herramienta bioinformática muy útil para evaluar qué tan parecidos son dos genomas bacterianos es el promedio de identidad nucleotídica ANI. Este algoritmo mide la similitud que tienen las regiones homólogas de dos genomas diferentes.

Para corroborar que nuestras asignaciones taxonómicas fueran correctas, se calculó el **porcentaje de identidad nucleotídica (ANI)** de cada uno de nuestros aislados clínicos secuenciados con la secuencia tipo de las especies *A. soli* y *A. junii*. En este análisis se agregó *A. baumannii* ACICU como control negativo. Un valor del ANI mayor al 95% indica que pertenecen a la misma especie. Todas las cepas de *A. junii* y *A. soli* tienen

valores del ANI mayores al 97% de identidad (Tabla 4), corroborando que nuestros aislados clínicos están identificados correctamente a nivel de especie tanto por el gen *rpoB*, como por el cálculo de ANI. Así mismo, todas nuestras cepas tuvieron un valor del ANI menor al 85% con respecto a *A. baumannii* ACICU debido a que pertenece a otra especie y difiere mucho en la similitud de secuencias.

Tabla 4. Cálculo del ANI de las cepas de *A. junii* y *A. soli*.

Cuando el porcentaje de identidad nucleotídica entre dos cepas es mayor al 95%, se considera que pertenecen a la misma especie. Se compararon todas las cepas de *A. junii* y *A. soli*, se agregó al estudio *A. baumannii* ACICU como control negativo, ya que pertenece a otra especie, cuando el resultado es 1 se debe a que se realizó la comparación de identidad nucleotídica consigo mismo. (Ab = *Acinetobacter baumannii*, Aj = *Acinetobacter junii*, As = *Acinetobacter soli*).

(ANI)	Ab_ACI CU	Aj_LGR C003	Aj_10 639	Aj_KCTC 12416	Aj_SH 205	Aj_NBRC 109759	Aj_MTCC 11364	Aj_CIP1 07470	Aj_TG 19608	Aj_NIP H182
Ab_ACICU	1	0.856	0.857	0.845	0.845	0.848	0.845	0.845	0.847	0.844
Aj_LGRC003	0.856	1	0.981	0.985	0.981	0.981	0.985	0.984	0.981	0.980
Aj_10639	0.857	0.981	1	0.980	0.983	0.982	0.980	0.980	0.982	0.979
Aj_KCTC12416	0.845	0.985	0.980	1	0.981	0.979	0.998	0.999	0.979	0.979
Aj_SH205	0.845	0.981	0.983	0.981	1	0.982	0.981	0.981	0.982	0.978
Aj_NBRC109759	0.848	0.981	0.982	0.979	0.982	1	0.979	0.980	0.999	0.978
Aj_MTCC11364	0.845	0.985	0.980	0.998	0.981	0.979	1	0.999	0.979	0.979
Aj_CIP107470	0.845	0.984	0.980	0.999	0.981	0.980	0.999	1	0.979	0.979
Aj_TG19608	0.847	0.981	0.982	0.979	0.982	0.999	0.979	0.979	1	0.978
Aj_NIPH182	0.844	0.980	0.979	0.979	0.978	0.978	0.979	0.979	0.978	1
Aj_L20	0.844	0.982	0.983	0.980	0.982	0.983	0.980	0.981	0.983	0.979
Aj_CIP64.5	0.848	0.981	0.982	0.979	0.982	0.999	0.979	0.980	0.999	0.978
Aj_NBRC110497	0.845	0.981	0.983	0.980	0.981	0.981	0.980	0.980	0.983	0.978
Aj_65	0.845	0.981	0.982	0.979	0.983	0.985	0.979	0.980	0.985	0.978
As_971H	0.850	0.864	0.865	0.862	0.866	0.861	0.862	0.861	0.861	0.855
As_ABBL054	0.837	0.858	0.859	0.850	0.853	0.848	0.847	0.850	0.849	0.846
As_KCTC_22184	0.837	0.857	0.857	0.846	0.845	0.845	0.846	0.847	0.845	0.849
As_NIPH_2899	0.837	0.859	0.860	0.848	0.848	0.847	0.848	0.846	0.847	0.842
As_CIP_110264	0.837	0.857	0.852	0.844	0.844	0.844	0.845	0.846	0.843	0.847
As_TCM341	0.838	0.862	0.860	0.850	0.850	0.846	0.850	0.852	0.847	0.850
As_GFJ2	0.837	0.854	0.855	0.848	0.846	0.845	0.848	0.849	0.842	0.852

Tabla 4. (Continuación)

(ANI)	Aj_L20	Aj_CIP64.5	Aj_NBR C110497	Aj_65	As_971H	As_AB BL054	As_KCTC_22184	As_NIPH_2899	As_CIP_110264	As_TCM341	As_GF J2
Ab_ACICU	0.844	0.848	0.845	0.845	0.850	0.837	0.837	0.837	0.837	0.838	0.837
Aj_LGRC003	0.982	0.981	0.981	0.981	0.864	0.858	0.857	0.859	0.857	0.862	0.854
Aj_10639	0.983	0.982	0.983	0.982	0.865	0.859	0.857	0.860	0.852	0.860	0.855
Aj_KCTC12416	0.980	0.979	0.980	0.979	0.862	0.850	0.846	0.848	0.844	0.850	0.848
Aj_SH205	0.982	0.982	0.981	0.983	0.866	0.853	0.845	0.848	0.844	0.850	0.846
Aj_NBRC109759	0.983	0.999	0.982	0.985	0.861	0.848	0.845	0.847	0.844	0.846	0.845
Aj_MTCC11364	0.980	0.979	0.980	0.979	0.862	0.847	0.846	0.848	0.845	0.850	0.848
Aj_CIP107470	0.981	0.980	0.980	0.980	0.861	0.850	0.847	0.846	0.846	0.852	0.849
Aj_TG19608	0.983	0.999	0.983	0.985	0.861	0.849	0.845	0.847	0.843	0.847	0.842
Aj_NIPH182	0.979	0.978	0.978	0.978	0.855	0.846	0.849	0.842	0.847	0.850	0.852
Aj_L20	1	0.983	0.983	0.983	0.862	0.848	0.842	0.845	0.841	0.855	0.845
Aj_CIP64.5	0.983	1	0.983	0.986	0.860	0.846	0.853	0.846	0.844	0.854	0.842
Aj_NBRC110497	0.983	0.983	1	0.983	0.860	0.849	0.847	0.844	0.846	0.847	0.849
Aj_65	0.983	0.986	0.983	1	0.864	0.849	0.849	0.847	0.846	0.850	0.846
As_971H	0.862	0.860	0.860	0.864	1	0.987	0.986	0.986	0.986	0.987	0.985
As_ABBL054	0.848	0.846	0.849	0.849	0.987	1	0.986	0.985	0.985	0.988	0.985
As_KCTC_22184	0.842	0.853	0.847	0.849	0.986	0.986	1	0.988	0.999	0.985	0.986
As_NIPH_2899	0.845	0.846	0.844	0.847	0.986	0.985	0.988	1	0.988	0.986	0.986
As_CIP_110264	0.841	0.844	0.846	0.846	0.986	0.985	0.999	0.988	1	0.985	0.986
As_TCM341	0.855	0.854	0.847	0.850	0.987	0.988	0.985	0.986	0.985	1	0.985
As_GFJ2	0.845	0.842	0.849	0.846	0.985	0.9854	0.986	0.986	0.986	0.985	1

En la tabla 5, se presenta un resumen de la caracterización genómica de los 3 aislados clínicos mexicanos.

Tabla 5. Comparación de las características generales de los 3 aislados clínicos mexicanos. Las secuencias se cargaron en la página (<https://www.patricbrc.org/>) del servidor PATRIC ("Pathosystems Resource Integration Center"), la cual es una base de datos para el análisis bioinformático de secuencias bacterianas.

Características	<i>A. junii</i> LRGC003	<i>A. junii</i> 10639	<i>A. soli</i> 971H
Tamaño del genoma (pb)	3,613,943	3,407,216	3,369,135
Plásmidos	0	1	6
Contenido G/C (%)	38.4	39	43.2
Contigs	125	256	192
N50	56,070	25,577	33,828
CDSs	3,441	3,927	3,307
Proteínas hipotéticas	933	1,143	736
tRNA	18	70	49
rRNA	3	21	9

Regiones repetidas	10	528	85
Genes de Resistencia a antibióticos (Resfinder)	0	11	0

6.4 Resistencia a antibióticos de los aislados clínicos mexicanos

Puesto que en los últimos años, el incremento notorio de la resistencia a los antibióticos, ha generado cepas del género *Acinetobacter* que son resistentes a 3, 5 o a todas las familias de antibióticos (MDR, PDR, y EDR) alrededor del mundo, es de nuestro interés enumerar e identificar los genes involucrados en la resistencia antimicrobiana de los aislados clínicos obtenidos de hospitales mexicanos.

ResFinder es una base de datos en línea que permite mediante un alineamiento de BLAST, la identificación de genes de resistencia antimicrobianos en datos de secuenciación de todo el genoma. Utilizamos ResFinder porque ha demostrado tener una alta concordancia entre sus predicciones, con las pruebas fenotípicas tradicionales que se realizan en los laboratorios. Para identificar qué genes de resistencia se encuentran en las cepas que se secuenciaron, se consultó esta base de datos seleccionando que enlistara todos los genes de resistencia a los antibióticos con un valor de identidad mayor al 30% y una cobertura del 60%. Estos valores pueden parecer poco exigentes, pero se utilizaron para poder detectar la posible existencia de genes con potencialidad de conferir resistencia a antibióticos pero lejanos a los ya descritos. Aún así, los genes de resistencia que se identificaron en nuestras cepas tuvieron identidades mayores al 85% y coberturas cercanas al 100%.

Las bacterias que poseen muchos genes de resistencia a los antibióticos representan un problema de salud pública, ya que cuando infectan a un paciente, su tratamiento es más difícil y los niveles de mortalidad que inducen, se incrementan. De nuestras muestras clínicas, solamente la cepa *A. junii* 10639 tiene genes de resistencia correspondientes a 5 familias de antibióticos: aminoglucósidos, beta-lactamasas, fluoroquinolonas, sulfonamidas y tetraciclinas (Tabla 6). Se puede clasificar como una bacteria MDR debido a que puede resistir al menos 1 agente dentro de 3 o más categorías de antimicrobianos. Afortunadamente, las cepas *A. junii* LRGC003 y *A. soli* 971H no presentan genes de resistencia a los antibióticos, por lo que el tratamiento

para los pacientes con infecciones causadas por estos microorganismos seguramente fue más fácil y eficiente.

Tabla 6. Genes de resistencia de las 3 cepas clínicas mexicanas de *Acinetobacter*.

Se utilizó el servidor en línea ResFinder para la identificación de genes de resistencia en los genomas de nuestros aislados clínicos. El criterio para el alineamiento de genes fue un 30% de identidad y un 60% de cobertura.

Resfinder 2.0	<i>Acinetobacter junii</i> 10639				
	Gen de resistencia	%Identidad	Longitud/Query	Contig	Número de acceso
Aminoglucósidos	<i>aac(6')-31</i>	85,77	478 / 519	fig 40215.18.peg.476	AJ640197
	<i>aph(3')-Via</i>	100	780 / 780	fig 40215.18.peg.1019	X07753
	<i>strA</i>	100	804 / 804	fig 40215.18.peg.1529	M96392
	<i>strB</i>	100	831 / 837	fig 40215.18.peg.1528	M96392
	<i>aac(3)-lia</i>	100	861 / 861	fig 40215.18.peg.1728	X51534
Beta-lactamasas	<i>blaIMP-18</i>	99,87	741 / 741	fig 40215.18.peg.477	EF184215
	<i>blaTEM-1B</i>	100	861 / 861	fig 40215.18.peg.1729	JF910132
Fluoroquinolona	<i>aac(6')Ib-cr</i>	99,4	498 / 600	fig 40215.18.peg.476	DQ303918
Sulfonamidas	<i>sul2</i>	100	816 / 816	fig 40215.18.peg.695	GQ421466
	<i>sul1</i>	100	840 / 840	fig 40215.18.peg.475	AY224185
Tetraciclinas	<i>tet(X)</i>	94,73	740 / 1167	fig 40215.18.peg.770	GU014535
No tiene genes de resistencia	<i>Acinetobacter LRGC003</i>				
No tiene genes de resistencia	<i>Acinetobacter soli</i> 971H				

Muchas veces relacionamos que, si una bacteria tiene muchos plásmidos será capaz de resistir a diversos antibióticos por contener genes de resistencia, pero esto no sucede en todos los casos. La cepa *A. 971H* posee 6 plásmidos y no se identificaron genes de resistencia a los antibióticos; por otro lado, un ejemplo contrario son los genes de resistencia intrínsecos a los antibióticos, los cuales se encuentran en el cromosoma sin la necesidad de tener plásmidos.

6.5 Selección de especies de *Acinetobacter* para el estudio

Con el fin de realizar un estudio de genómica comparativa entre especies ambientales y nosocomiales del género *Acinetobacter* que nos permita tener una idea de cuáles son los genes que posee una cepa nosocomial que le permiten sobrevivir en el hospital y causar infecciones en los pacientes que ahí se tratan, se decidió identificar aquellos genes que solamente están presentes en aislados clínicos pero que están ausentes en

las cepas ambientales. Suponemos que esos genes pudieran estar relacionados a factores de virulencia o a la sobrevivencia en los fómites. Para hacer este análisis se seleccionaron aquellas especies que contaran con las siguientes características:

- 1) Estar disponibles en una base de datos (NCBI).
- 2) Tener secuenciado el genoma completo de aislados clínicos y ambientales.
- 3) Las secuencias deben tener buena calidad de ensamblaje. Se descartaron en el estudio aquellos genomas con más de 250 *contigs*.

Las especies que cumplieron con estos requisitos fueron 11 cepas de ***Acinetobacter junii***; 6 cepas de ***Acinetobacter soli***; 10 cepas de ***Acinetobacter johnsonii***; 13 cepas de ***Acinetobacter calcoaceticus*** y 9 cepas de ***Acinetobacter radioresistens***. En total se obtuvieron 49 genomas.

6.6 Clasificación taxonómica correcta de las especies de *Acinetobacter*

Para evitar errores en la clasificación taxonómica de las especies de *Acinetobacter*, que es un problema más o menos común en las cepas depositadas en NCBI, sobre todo aquellas clasificadas hace algunos años, se cercioró mediante el cálculo del ANI y el análisis filogenético del gen *rpoB*, que las secuencias de las cepas de nuestro interés depositadas en NCBI estuvieran identificadas correctamente a nivel de especie. Para nuestra sorpresa, 6 de los genomas de nuestro interés estaban clasificadas erróneamente. Sin embargo, gracias a nuestros análisis de *rpoB* y de ANI se pudo reubicarlas en la especie a la que pertenecen y se clasificaron de la siguiente manera:

- 1) *A. lwoffii* WJ10621 pertenece taxonómicamente a ***A. johnsonii***.
- 2) *A. haemolyticus* JSKF06 pertenece taxonómicamente a ***A. venetianus***.
- 3) *A. calcoaceticus* WP19 pertenece taxonómicamente a ***A. pittii***.
- 4) *A. calcoaceticus* XM1570 pertenece taxonómicamente a ***A. pittii***.
- 5) *A. calcoaceticus* EGD_AQ_BF14 pertenece taxonómicamente a ***A. pittii***.
- 6) *A. calcoaceticus* NCTC7364 pertenece taxonómicamente a ***A. baumannii***.

Las secuencias que no cumplieron con nuestros requisitos se descartaron de este estudio (sección 5.5). El resto de las 52 cepas utilizadas en el estudio se agruparon correctamente por especie inicialmente reportada y todas mostraron un porcentaje de similitud mayor a 95%. (Figura 9).

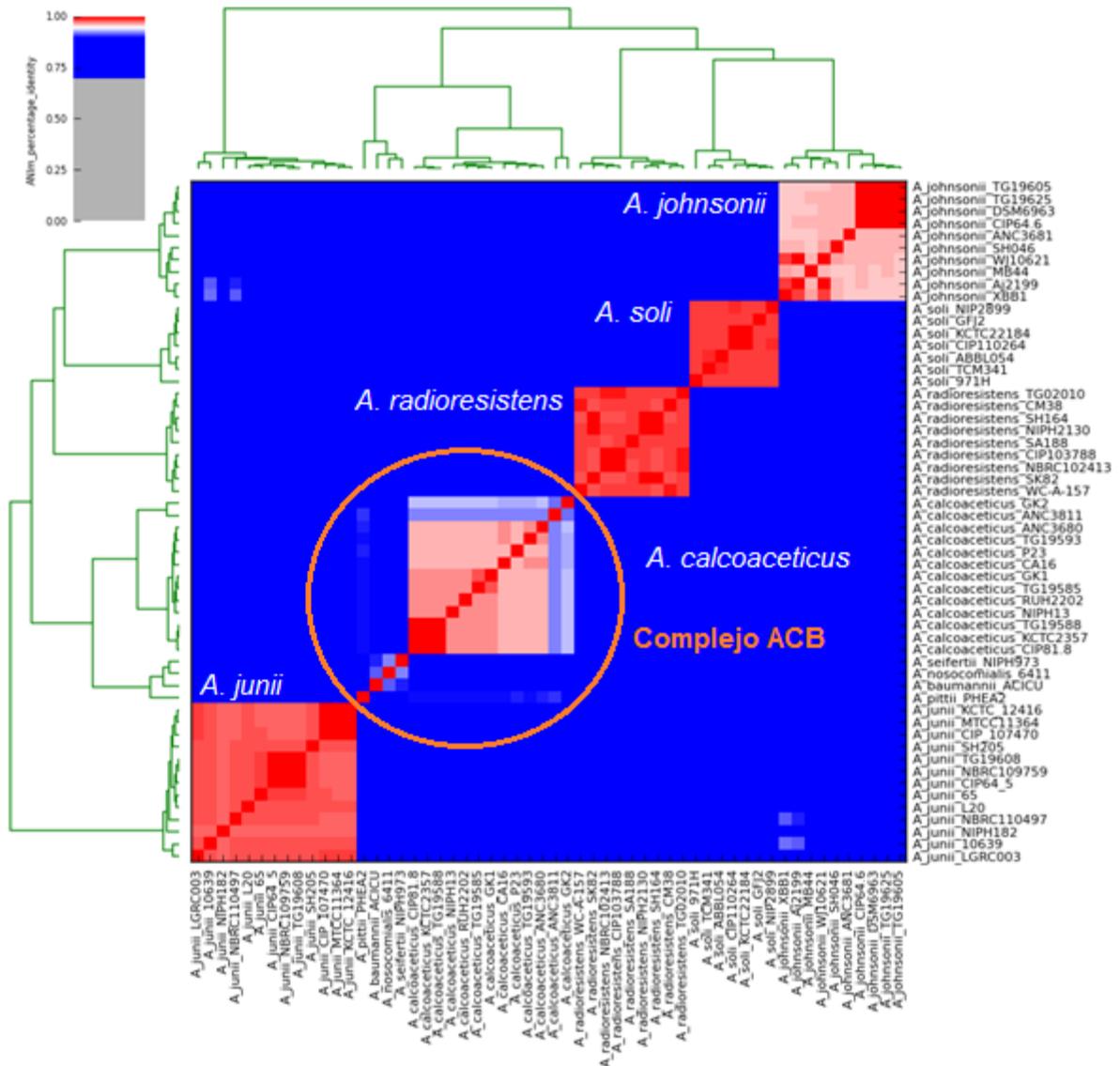


Figura 9. Cálculo del porcentaje de identidad nucleotídica (ANI).

Se calculó el ANI de los 52 genomas utilizados en este estudio utilizando pyani. Las muestras se agruparon correctamente en 5 especies y se indicó en círculo naranja el complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (ACB).

El gen *rpoB* constituye uno de los pocos genes candidatos para la identificación bacteriana utilizado en los análisis taxonómicos y filogenéticos de cepas de *Acinetobacter*. Debido a su distribución universal en las bacterias y su alto poder discriminatorio entre cepas estrechamente relacionadas, se utilizó el gen *rpoB* para realizar un segundo análisis filogenético de las 52 cepas seleccionadas para corroborar por otra estrategia su ubicación taxonómica (Figura 10). En este análisis se espera observar en un árbol filogenético construido con las secuencias de *rpoB* una agrupación por especie acorde a lo identificado con ANI. Para poder realizar este estudio, se extrajo la secuencia del gen *rpoB* de los 52 genomas y se verificó que en todos los casos el gen estuviera completo y en la misma orientación. En este estudio se anexaron 4 especies pertenecientes al complejo ACB (*A. nosocomialis* 6411, *A. seifertii* NIPH973, *A. baumannii* ACICU, *A. pittii* AP882) como controles positivos. Al igual que en el ANI, todas las cepas se agruparon correctamente por especie. Una medida de que el análisis es adecuado es que las 13 cepas de *A. calcoaceticus* se agruparon con el complejo ACB. En resumen, el cálculo del ANI y el análisis filogenético del gen *rpoB*, confirmó que las 52 cepas de *Acinetobacter* tienen una clasificación taxonómica correcta.

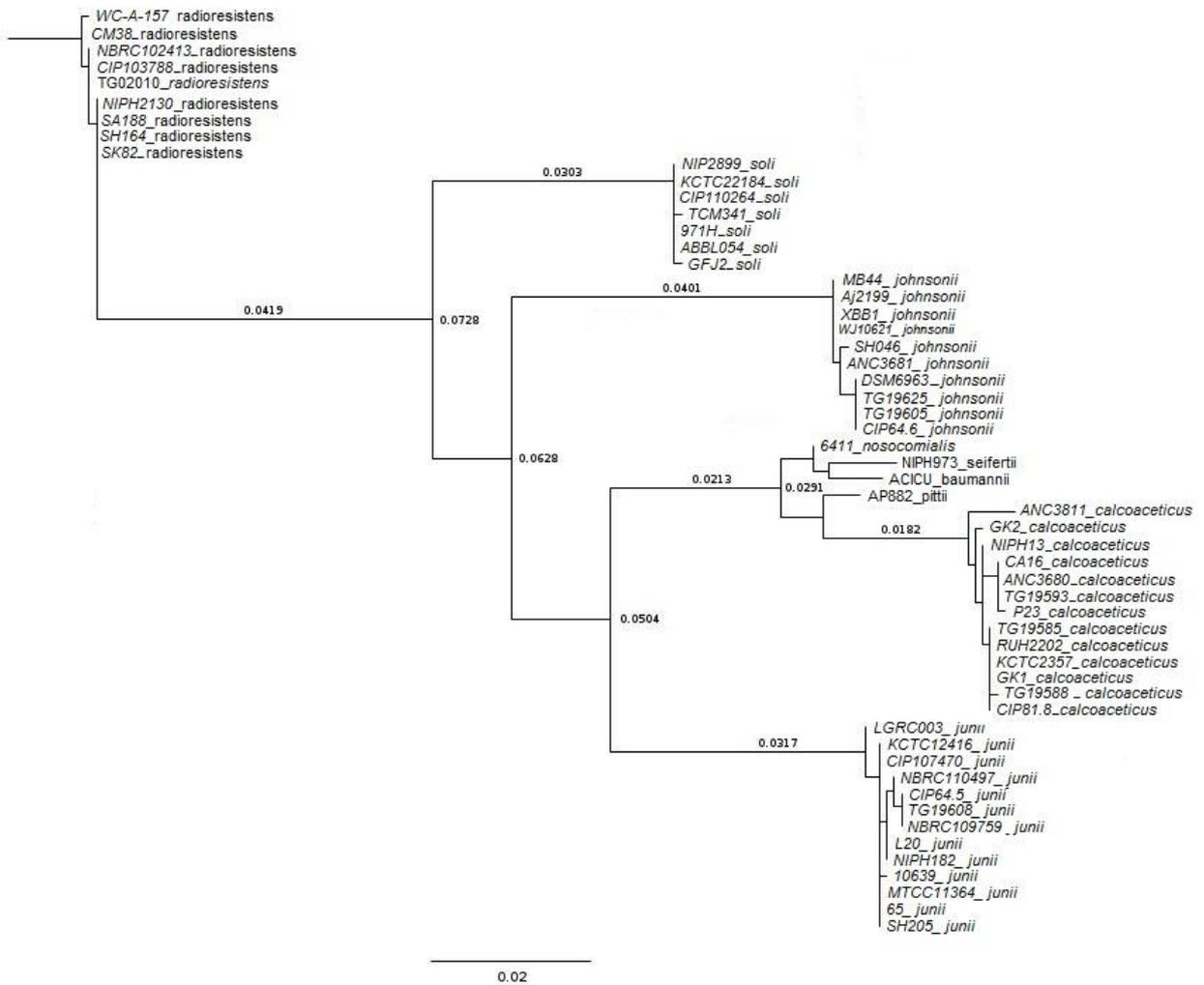


Figura 10: Dendrograma del gen *rpoB* de las 52 cepas de *Acinetobacter* utilizadas en el estudio. Para realizar el dendrograma se utilizó el alineamiento de las secuencias de aminoácidos del gen *rpoB*; para determinar el mejor modelo evolutivo de sustitución de aminoácidos se utilizó ProtTest. El árbol filogenético se infirió utilizando PhyML (versión 3.0) bajo el modelo de aminoácidos LG y se utilizó la prueba *SH-like* por defecto para evaluar el soporte de las ramas del análisis.

6.7 Caracterización del pangenoma, genes accesorios y genes únicos

Se diseñaron 3 estrategias diferentes para realizar un análisis genómico comparativo y obtener información importante de los aislados ambientales y clínicos de *Acinetobacter*: la primera estrategia fue identificar todos aquellos genes que estuvieran solamente en las cepas ambientales o exclusivamente en las hospitalarias. Segundo, se determinó si existía un conjunto de genes compartidos entre todas las cepas aisladas de hospital que no estuvieran en ninguna de las cepas ambientales. Por

último, se determinó si los genes que se han asignado como importantes en la virulencia de *A. baumannii* están presentes o no en las otras cepas de *Acinetobacter*.

Para llevar a cabo este análisis comparativo, todas las secuencias disponibles en NCBI de las cepas de *A. junii*, *A. soli*, *A. johnsonii*, *A. radioresistens* y *A. calcoaceticus* se descargaron vía ftp y se anexaron las secuencias genómicas de nuestras 3 cepas de aislados clínicos mexicanos. Para tener una uniformidad en las anotaciones de los genomas, se reanotaron con PROKKA, una vez hecho esto, se identificó el pangenoma, genes *core*, genes accesorios y genes únicos usando Roary (Tabla 7).

Tabla 7. Identificación del pangenoma de las 5 especies del género *Acinetobacter*. Mediante Roary se determinó el pangenoma y el genoma *core* de cada especie de las cepas utilizadas en este estudio.

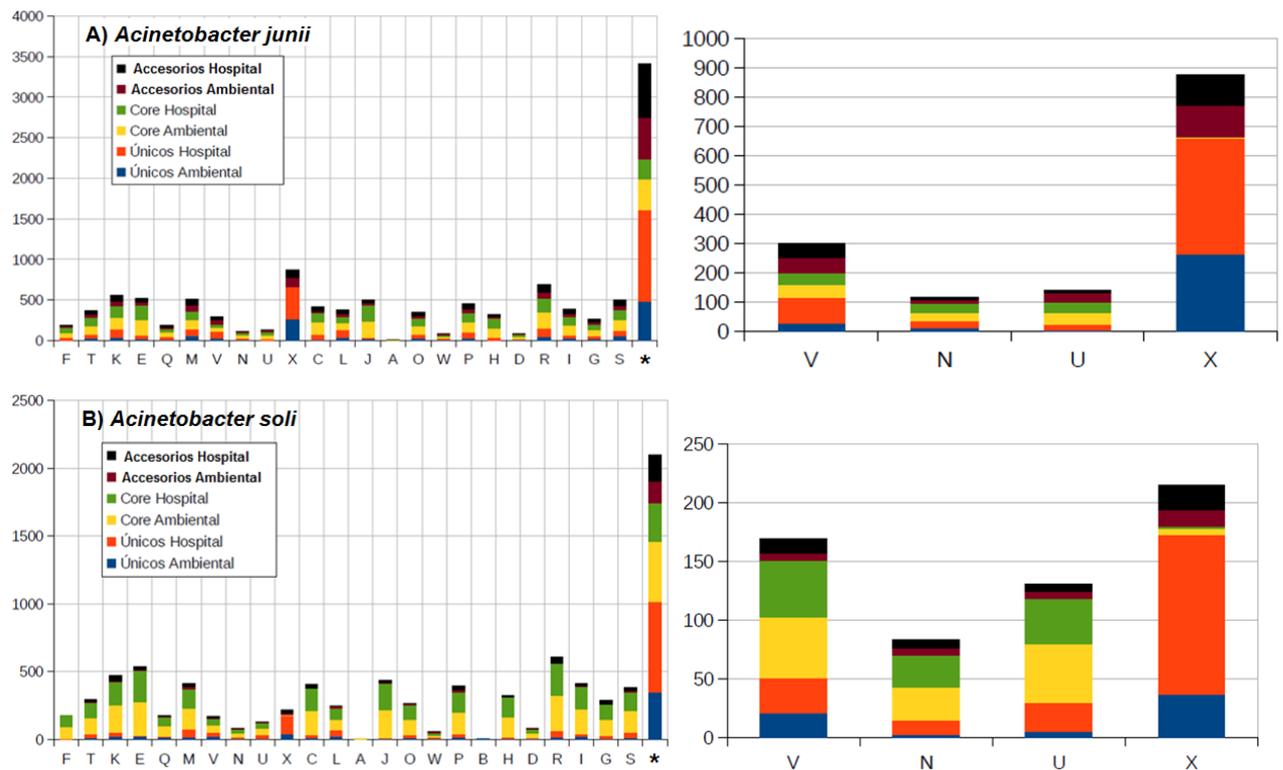
Especies	Número de genomas	Genoma <i>Core</i> (genes)	Pangenoma (genes)
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	13	2,080	8,316
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	10	1,972	7,552
<i>Acinetobacter junii</i>	13	1,991	7,963
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	9	2,351	5,119
<i>Acinetobacter soli</i>	7	2,442	8,316

Una vez obtenido el pangenoma de las 5 especies de *Acinetobacter*, se utilizó la matriz de presencia y ausencia de genes (presencia indicado con el número “1” y ausencia con el número “0”) generado por Roary para identificar y separar en grupos el genoma *core*, el genoma accesorio y los genes únicos. En la figura 11, se ejemplifica cómo se realizó el proceso de identificación de grupos de genes para cada especie de *Acinetobacter*, utilizando el Script generado en Perl (Materiales y métodos 4.9).

	H	H	H	A	A	A	
	cepa A	cepa B	cepa C	cepa D	cepa E	cepa F	
gene 1	1	1	1	1	1	1	Genes <i>core</i>
gene 2	1	1	1	1	1	1	
gene 3	1	0	1	0	0	0	Genes accesorios
gene 4	0	0	0	1	1	0	
gene 5	1	0	0	0	0	0	Genes únicos
gene 6	0	0	0	0	1	0	

Figura 11. Identificación del pangenoma, genes accesorios y genes únicos de las cepas 5 especies de *Acinetobacter*. Se utilizó la matriz de presencia y ausencia de genes (presencia indicado con el número “1” y ausencia con el número “0”) generado por Roary, se separaron las cepas ambientales (A) de las cepas hospitalarias (H) de cada especie. El pangenoma se enlista en la columna de genes, en la figura solamente enumeramos 6 genes cualesquiera como ejemplo. El grupo de genes presentes en todas las cepas se definió como los **genes core**. Aquellos genes presentes únicamente en las cepas hospitalarias y no en las cepas ambientales o viceversa, se determinaron como los **genes accesorios**. Por último, los genes presentes únicamente en una cepa, se definieron como los **genes únicos**.

Como resultado se obtuvo el genoma *core*, el genoma accesorio y los genes únicos de las cepas hospitalarias y las cepas ambientales de cada especie (6 grupos en total). Para inferir la función general de cada uno de los genes incluidos en estos grupos se generó un archivo multi-FASTA con todas las secuencias de los genes de cada grupo y se realizó un alineamiento con el *software* BLASTx contra la base de datos COG (“*clusters of orthologous groups*”). El criterio para el alineamiento fue tener una identidad mínima del 35% y una cobertura del 75%. Los resultados se graficaron en la figura 12.



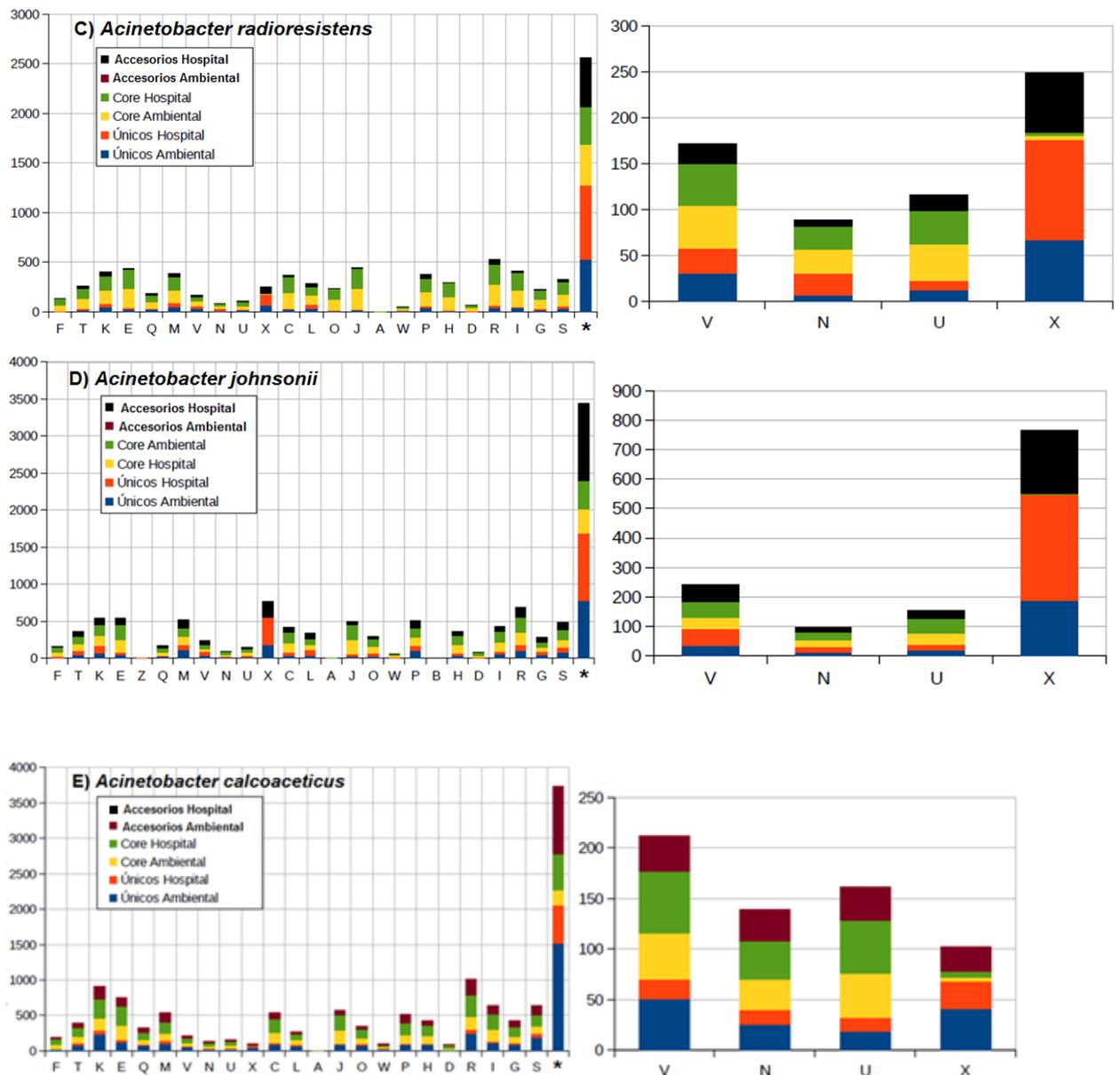


Figura 12. Distribución del pangenoma de acuerdo a la clasificación funcional COG. Para la asignación en una categoría funcional general del pangenomade las 5 especies de *Acinetobacter* (A = *A. junii*, B = *A. soli*, C = *A. radioresistens*, D = *A. johnsonii* y E = *A. calcoaceticus*), la anotación COG se realizó utilizando el software BLASTx contra la base de datos COG (identidad 35 %, cobertura 75%). El eje-y indica el número de genes, mientras que el eje-x indica las siguientes categorías COG: (F) Transporte y metabolismo de nucleótidos; (T) Mecanismos de transducción de señal; (K) Transcripción; (E) Transporte y metabolismo de aminoácidos; (Q) Biosíntesis de metabolitos secundarios, transporte y catabolismo; (M) Pared celular, biogénesis de la membrana; (V) Mecanismos de defensa; (N) Motilidad; (U) Tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular; (X) Moviloma, profagos, transposones; (C) Conversión y producción de energía; (L) Replicación, recombinación y reparación; (A) Modificación y procesamiento de RNA; (J) Traducción, biogénesis y estructura ribosomal; (O) Modificación postranscripcional, recambio proteico y chaperonas; (W) Estructuras extracelulares; (P) Transporte y metabolismo de iones inorgánicos; (H) Transporte y metabolismo de coenzimas; (D) Control del ciclo celular, división celular, partición cromosomal; (R) Predicción de la función general; (I) Transporte y metabolismo de lípidos; (G) Transporte y metabolismo de carbohidratos; (S) Proteína hipotética (función desconocida); (*)

Genes sin asignación funcional COG. De lado derecho de la imagen solamente se graficaron aquellas categorías relacionadas con la virulencia: V, N, U, X.

La categoría COG relacionada con la virulencia que contiene más genes de las 5 especies de *Acinetobacter* es la del moviloma (contiene 2,208 genes) y la de menor cantidad de genes es la de motilidad (contiene 520 genes). En todas las especies el moviloma fue la categoría con mayor número de genes con excepción de *A. calcoaceticus*, el cual tiene un mayor número de genes en la categoría de mecanismos de defensa (212 genes) (Tabla 8).

Tabla 8. Número de genes asociados a factores de virulencia de las 5 especies de *Acinetobacter* utilizadas en el estudio.

Se identificaron los genes correspondientes a las categorías COG relacionadas con factores de virulencia: (V) Mecanismos de defensa; (N) Motilidad; (U) Tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular; (X) Moviloma, profagos, transposones.

Especie	Genes (V)	Genes (N)	Genes (U)	Genes (X)
<i>A. calcoaceticus</i>	212	139	162	102
<i>A. johnsonii</i>	241	94	153	767
<i>A. junii</i>	297	116	140	875
<i>A. radioresistens</i>	171	88	116	249
<i>A. soli</i>	169	83	131	215
	Total = 1090	Total = 520	Total = 702	Total = 2208

Hay un caso particular en este experimento, *A. calcoaceticus* es primordialmente una especie ambiental, mientras que *A. junii* es una especie aislada de infecciones hospitalarias y ambos tienen 13 genomas secuenciados. Al momento de comparar estas dos especies no existe una diferencia representativa entre las categorías de (V) Mecanismos de defensa; (N) Motilidad; (U) Secreción y transporte vesicular (en promedio varían en 46.6 genes) pero la gran diferencia se encuentra en la categoría (X), en donde *A. calcoaceticus* tiene 102 genes y *A. junii* tiene 875 genes, contiene 8.5 veces más genes asociados al moviloma.

Puesto que los genes del moviloma están sobrerrepresentados en la mayor parte de las especies de nuestro estudio, analizamos cuáles de estos genes están presentes en el

genoma *core*, genoma accesorio y genes únicos. En todas las especies de *Acinetobacter* (menos en *A. calcoaceticus*) el grupo de genes que predomina al tener mayor cantidad de genes relacionados al moviloma, es el grupo de genes únicos hospitalarios (Figura 12 A, B, C y D, barra color naranja). Esto no ocurre en el caso de *A. calcoaceticus*, donde el grupo que contiene más genes relacionados al moviloma es el grupo de genes únicos ambientales (Figura 12 E, barra color azul). Los genes del moviloma se encuentran distribuidos en menor cantidad en el grupo de genes *core* de todas las especies de *Acinetobacter*, tanto en aislados clínicos como ambientales (Figura 12 A, B, C, D y E, barras color verde y amarillo).

Los genes *core* y genes únicos de las categorías (V), (N), y (U) de las 5 especies de *Acinetobacter* se mantienen en proporciones muy parecidas. Para visualizar mejor la comparación de las categorías relacionadas a la virulencia entre las cepas hospitalarias y las ambientales, se graficaron todos los genes en una misma figura (Figura 13).

Especie	Categoría COG	Genes únicos		Genes core		Genes accesorios	
		Ambiental	Hospital	Ambiental	Hospital	Ambiental	Hospital
<i>A. calcoaceticus</i>	V	51	19	46	61	35	0
	N	26	14	30	38	31	0
	U	19	13	44	53	33	0
	X	41	27	4	6	24	0
<i>A. johnsonii</i>	V	32	57	52	40	0	60
	N	12	16	27	23	0	16
	U	16	20	48	41	0	28
	X	188	360	3	1	0	215
<i>A. junii</i>	V	29	86	43	41	52	46
	N	11	22	30	32	12	9
	U	2	20	39	38	32	9
	X	263	396	3	1	109	103
<i>A. radioresistens</i>	V	31	27	46	46	0	21
	N	7	23	26	26	0	6
	U	12	10	40	37	0	17
	X	67	109	5	3	0	65
<i>A. soli</i>	V	21	30	52	48	6	12
	N	3	12	28	27	6	7
	U	5	25	50	39	6	6
	X	37	136	5	2	14	21
Total =		873	1422	621	603	360	641

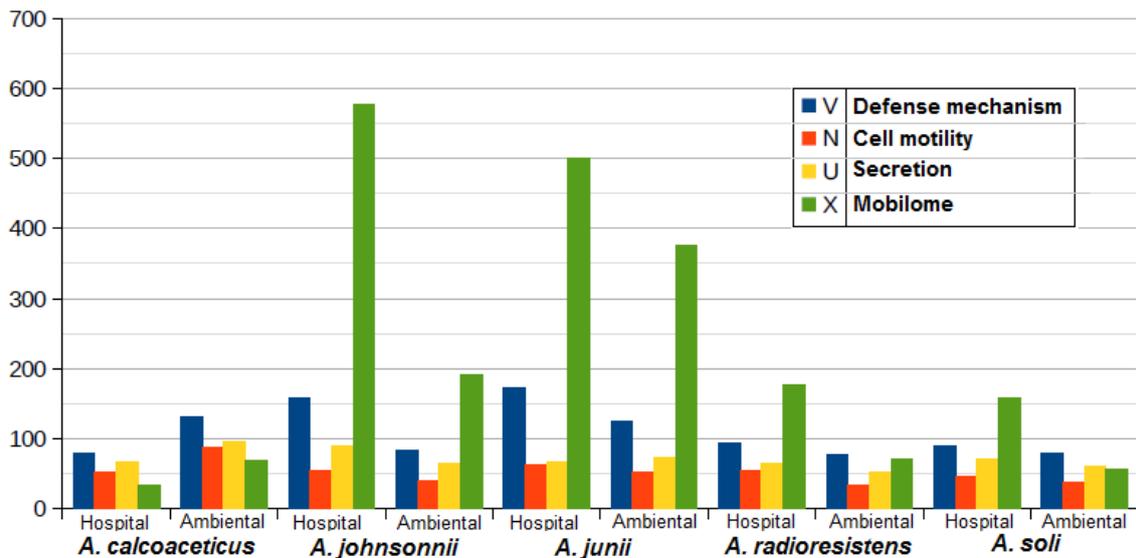


Figura 13. Asignación de funcionalidad general (COG) a genes relacionados a virulencia.

Se graficaron únicamente los genes relacionados a virulencia (Letras V, N, U, X) de cepas hospitalarias y ambientales de *Acinetobacter*.

Posteriormente, realizamos un mapa de calor graficando la matriz de presencia y ausencia de genes correspondiente a las 5 especies de *Acinetobacter*. En el mapa de calor, observamos en el eje horizontal (x) las 52 cepas agrupadas en 5 especies del género *Acinetobacter*, mientras que en el eje vertical (y) tenemos el repertorio completo de genes o pangenoma. Los genes *core* de cada especie se pueden identificar en un rectángulo grande de color verde que muestra los genes compartidos en todas las cepas de cada especie (Figura 14). Se puede observar que el patrón de genes entre las 5 especies es muy variado y no en todos los casos se logran agrupar y separar las cepas hospitalarias de las ambientales. Lo que nos llevó a generar la siguiente pregunta: ¿Los genes responsables de favorecer a una cepa para establecerse en un ambiente nosocomial se encuentran en el genoma *core*, en el genoma accesorio o en los genes únicos?

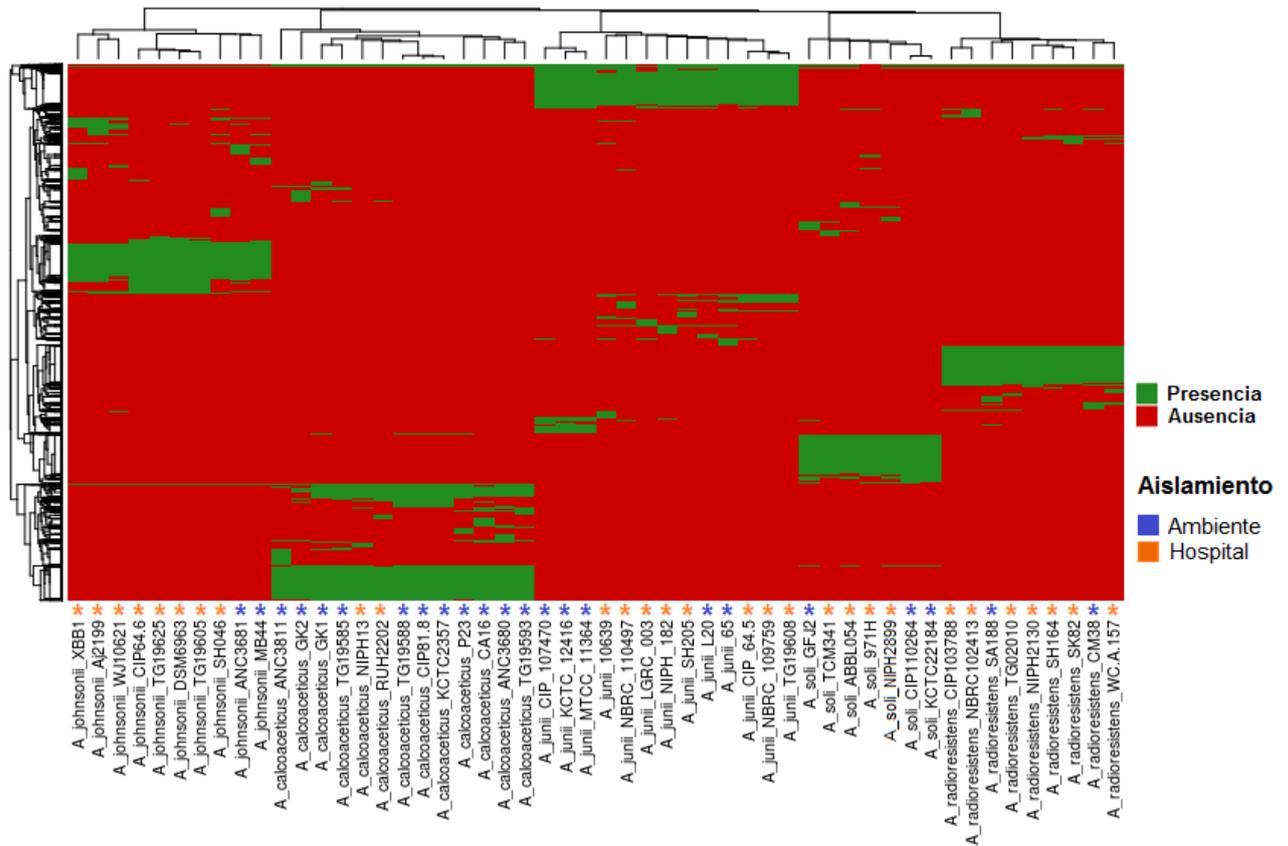


Figura 14. Mapa de calor del pangenoma de las 52 cepas de *Acinetobacter*. Se identificó el genoma *core*, los genes accesorios y genes únicos de cada especie, mediante Roary. En la matriz se observa la presencia (color verde) y ausencia (color rojo) de genes. El asterisco naranja indica que el aislamiento es hospitalario, mientras que el asterisco azul indica un aislado ambiental.

Para responder la pregunta, nos enfocamos primero en los genes *core* de cada especie, y realizamos un árbol filogenético basado en el alineamiento de los SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) de los genes *core* (Figura 15). El razonamiento del experimento es identificar si cambios puntuales o mutaciones en este grupo de genes, es suficiente para brindarles alguna ventaja selectiva para establecerse en los hospitales. Las cepas de aislados clínicos (asterisco rojo) y las cepas ambientales (asterisco verde) no se separan por especie y no se agrupan entre ellas, lo que quiere decir que la respuesta no está en el genoma *core*, cambios puntuales en los genes *core* no determinan que una cepa obtenga una ventaja para establecerse en nosocomios.

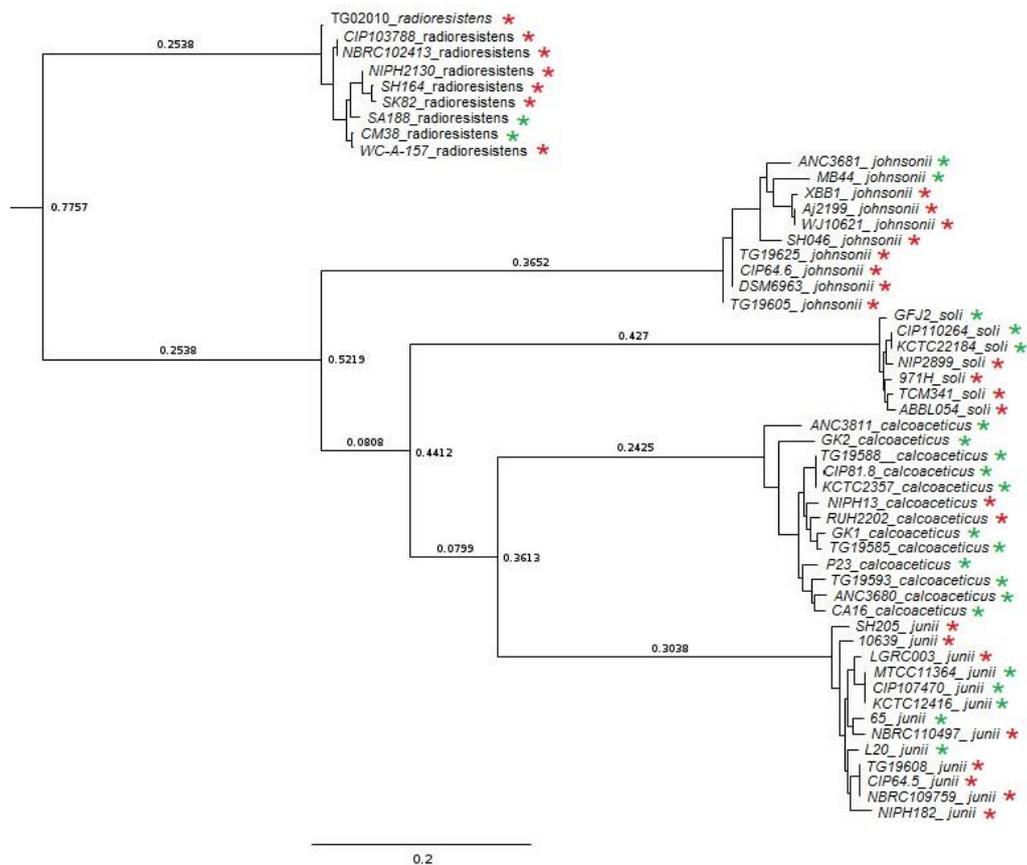


Figura 15. Árbol filogenético de las 52 cepas de *Acinetobacter*.

Para el análisis se utilizó en el alineamiento de los SNPs de los genes *core* generado por Roary. Se construyó un árbol filogenético de máxima verosimilitud utilizando jModelTest, el cual incluye el software PhyML versión 3.0. El mejor modelo evolutivo para los genes *core* fue GTR+I+G; se realizaron 1000 réplicas de *bootstap* para evaluar la robustez de la filogenia. El asterisco rojo indica que el aislamiento es hospitalario, mientras que el asterisco verde indica un aislado ambiental.

Para la identificación de los genes hábitat-especie-específico de aislados nosocomiales y ambientales de *Acinetobacter*, se utilizó de igual manera la matriz de presencia y ausencia de genes, solo que en este caso se modificó el Script (materiales y métodos 5.9) para que la identificación fuera más estricta, agrupando aquellos genes que estuvieran presentes únicamente en aislados nosocomiales, pero ausentes en aislados ambientales y viceversa (Figura 16).

	H			A		
	cepa A	cepa B	cepa C	cepa D	cepa E	cepa F
gene 1	1	1	1	1	1	1
gene 2	1	1	1	1	1	1
gene 3	1	1	1	0	0	0
gene 4	0	0	0	1	1	1
gene 5	1	0	0	0	0	0
gene 6	0	0	0	0	1	0

Genes *core*

Genes hábitat específico

Genes únicos

Figura 16. Identificación de los genes hábitat-específicos de las 5 especies de *Acinetobacter*. Se utilizó la matriz de presencia y ausencia de genes (presencia indicado con el número “1” y ausencia con el número “0”) generado por Roary, se separaron las cepas ambientales (A) de las cepas hospitalarias (H) de cada especie. El pangenoma se enlista en la columna de genes, en la figura solamente enumeramos 6 genes cualesquiera como ejemplo. Se modificó el Script utilizado anteriormente para identificar aquellos genes presentes en las cepas hospitalarias y ausentes en las cepas ambientales y viceversa. A este grupo de genes se les definió como **genes hábitat específico**.

Se identificaron un total de 66 genes exclusivos de las cepas provenientes de aislados clínicos de las 5 especies de *Acinetobacter*. Para inferir la función general de los 66 genes, se extrajo la secuencia nucleotídica de cada gene del pangenoma de cada especie y se realizó un alineamiento contra la base de datos COG, el criterio para el alineamiento fue tener una identidad mínima del 35% y 75% de cobertura. De los 66 genes hábitat-específicos nosocomiales, solamente se les asignó una categoría funcional COG a 39 genes (Anexo II), los 27 genes restantes no cumplieron con el criterio del porcentaje del alineamiento, pero se realizó una búsqueda de similitud de secuencias (BLASTx no redundante) para identificar dominios conservados para inferir su posible función (Anexo III).

De todos los genes presentes únicamente en cepas hospitalarias, 38 genes se relacionaron con factores de virulencia asociados a bacterias patógenas, los cuales se distribuyeron de la siguiente manera (Tabla 9):

Tabla 9. Genes presentes únicamente en aislados clínicos. Listado de los 38 genes que solamente se encuentran presentes en aislados clínicos y ausentes en aislados ambientales por especie.

<i>Acinetobacter junii</i>			
Gen	Descripción	Dominio Conservado	Referencia
<i>lspA₁</i>	Lipoprotein signal peptidase	<i>lspA</i> ; Peptidase_A8	Sander <i>et al.</i>, 2004 ; "Lipoprotein processing is required for virulence of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ."
<i>tolB</i>	Translocation protein TolB (Transport – Pathogenesis)	TolB; Propeller_TolB	Lo Sciuto <i>et al.</i>, 2014 ; "The Periplasmic Protein TolB as a Potential Drug Target in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ."
<i>group_1295</i>	MBL fold metallo-hydrolase	Metallo-hydrolase-like_MBL-fold super family	Daiyasu <i>et al.</i>, 2001 ; "Expansion of the zinc metallo-hydrolase family of the β -lactamase fold".
<i>sdpR₂</i>	Metal detoxification, efflux and sequestration	ArsR	Neyt <i>et al.</i>, 1997 ; "Virulence and arsenic resistance in <i>Yersinia</i> ."
<i>blh_2</i>	Protein tyrosine phosphatases (PTP)	PTPc super family	Xu <i>et al.</i>, 2015 : "Structural and Biochemical Analysis of Tyrosine Phosphatase Related to Biofilm Formation A (TpbA) from the Opportunistic Pathogen <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1".
<i>Acinetobacter soli</i>			
Gen	Descripción	Dominio Conservado	Referencia
<i>intA</i>	Integrase, site-specific recombinase XerD	DUF4102 super family	Mosquera-Rendón <i>et al.</i>, 2016 ; "Pangenome-wide and molecular evolution analyses of the <i>Pseudomonas aeruginosa</i> species
<i>group_1269</i>	Transposase	Rve_3 super family	Hudson <i>et al.</i>, 2014 ; "Resistance Determinants and Mobile Genetic Elements of an NDM-1 Encoding <i>Klebsiella pneumoniae</i> Strain"
<i>group_1020</i>	Ankyrin repeat protein	ANK Superfamily	Al-Khodor <i>et al.</i>, 2010 ; "Ankyrin-repeat containing proteins of microbes: a conserved structure with functional diversity".
<i>yfcG₁</i>	Glutathione S-transferase	GstA Superfamily	Pettersen <i>et al.</i>, 2016 ; "Coordination of Metabolism and Virulence Factors Expression of Extraintestinal Pathogenic <i>Escherichia coli</i> Purified from Blood Cultures of Patients with Sepsis".
<i>czcC₂</i>	Heavy metal RND efflux outer membrane protein	OEP Superfamily; TolC	Pérez <i>et al.</i>, 2012 ; "Involvement of the AcrAB-TolC efflux pump in the resistance, fitness, and virulence of <i>Enterobacter</i> ".
<i>cas3</i>	Type I-F CRISPR-associated helicase Cas3	Cas3_Cas2_I-F	Louwen <i>et al.</i>, 2014 ; "The role of CRISPR-Cas systems in virulence of pathogenic bacteria".
<i>Acinetobacter radioresistens</i>			
Gen	Descripción	Dominio Conservado	Referencia
<i>intA</i>	Integrase, site-specific recombinase XerD	DUF4102 super family	Mosquera-Rendón <i>et al.</i>, 2016 ; "Pangenome-wide and molecular evolution analyses of the <i>Pseudomonas aeruginosa</i> species."
<i>group_382</i>	Phage morphogenesis protein	Phage_tail_S super family	Xia & Wolz, 2014 ; "Phages of <i>Staphylococcus aureus</i> and their impact on host evolution".
<i>group_881</i>	Hypothetical protein	Gp37 super family;Methyltransf_23	Erova <i>et al.</i>, 2006 ; "DNA adenine methyltransferase influences the virulence of <i>Aeromonas hydrophila</i> ".
<i>group_890</i>	AlpA family transcriptional regulator	Phage_AlpA; HTH_MerR-SF Superfamily	McFarland <i>et al.</i>, 2015 ; "A self-lysis pathway that enhances the virulence of a pathogenic bacterium ".

<i>Acinetobacter johnsonii</i>			
Gen	Descripción	Dominio Conservado	Referencia
<i>group_1303</i>	Antibiotic biosynthesis monooxygenase	ABM super family; NAT_SF	Beceiro et al., 2013; "Antimicrobial Resistance and Virulence: a Successful or Deleterious Association in the Bacterial World".
<i>fruA</i>	PTS fructose transporter subunit IIBC	PRK09765 super family	Houot et al., 2010; "The phosphoenolpyruvate phosphotransferase system regulates <i>Vibrio cholerae</i> biofilm formation through multiple independent pathways".
<i>group_2132</i>	Heavy metal resistance protein CzcA	HepA; SNF2 family N-terminal domain	Neelapu et al., 2015; "Targets against <i>Helicobacter pylori</i> and other tumor-producing bacteria".
<i>group_2133</i>	XRE family transcriptional regulator	XRE Family	Ibarra et al., 2013; "Global analysis of transcriptional regulators in <i>Staphylococcus aureus</i> ".
<i>group_3326</i>	Outer membrane protein transport protein, Omp1/FadL/TodX family	OM_channels super family	Kostakioti et al., 2005; "Mechanisms of Protein Export across the Bacterial Outer Membrane".
<i>ptsI-2</i>	Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase	PtsA; PtsP Superfamily	Houot et al., 2010; "The phosphoenolpyruvate phosphotransferase system regulates <i>Vibrio cholerae</i> biofilm formation through multiple independent pathways".
<i>group_3608</i>	Toxin HipA	HipA_C; HipA_N	Germain et al., 2013; "Molecular mechanism of bacterial persistence by HipA".
<i>adaA</i>	AraC family transcriptional regulator	HTH_ARAC	Gallegos et al., 1997; "AraC/XylS family of transcriptional regulators".
<i>group_35</i>	IS66 family element, transposase	DDE_Tnp_IS66_C	Venkatesan et al., 2001; "Complete DNA Sequence and Analysis of the Large Virulence Plasmid of <i>Shigella flexneri</i> ."
<i>group_1362</i>	Toxin-antitoxin system, Xre family	XRE Family	Ibarra et al., 2013; "Global analysis of transcriptional regulators in <i>Staphylococcus aureus</i> ".
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>			
Gen	Descripción	Dominio Conservado	Referencia
<i>group_3086</i>	Bacteriophage protein	GP38 super family	Trojet et al., 2011; The gp38 Adhesins of the T4 Superfamily: A Complex Modular Determinant of the Phage's Host Specificity".
<i>cinA</i>	Competence-damaged protein	CinA super family	Zhu et al., 2015; "Deletion analysis of <i>Streptococcus pneumoniae</i> late competence genes distinguishes virulence determinants that are dependent or independent of competence induction".
<i>group_6383</i>	Outer membrane protein transport protein, Omp1/FadL/TodX family	OM_channels super family	Li & Nikaido, 2009; "Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria: an Update."
<i>group_3083</i>	Phage head morphogenesis protein	Phage_Mu_F super family	Geuskens et al., 1992; "Virulence in bacteriophage Mu: a case of trans-dominant proteolysis by the <i>Escherichia coli</i> Clp serine protease".
<i>group_3073</i>	Membrane protein	MATE_Wzx-like super family	Hvorup et al., 2003; "The multidrug/oligosaccharidyl-lipid/polysaccharide

			(MOP) exporter superfamily".
<i>group_3078</i>	Predicted membrane protein	DUF2070; DltB	Nakhamchik et al., 2007; "Identification of a Wzy polymerase required for group IV capsular polysaccharide and lipopolysaccharide biosynthesis in <i>Vibrio vulnificus</i> ".
<i>ybiP</i>	Phosphoethanolamine transferase	ALP_like_superfamily	Wanty et al., 2013; "The structure of the neisserial lipooligosaccharide phosphoethanolamine transferase A (LptA) required for resistance to polymyxin".
<i>group_3084</i>	CARB family carbenicillin-hydrolyzing class A beta-lactamase	-	Melano et al., 2002; "New Carbenicillin-Hydrolyzing β -Lactamase (CARB-7) from <i>Vibrio cholerae</i> Non-O1, Non-O139 Strains Encoded by the VCR Region of the <i>V. cholerae</i> genome".
<i>group_3085</i>	Phage tail protein	T4_gp9_10 super family	Dobbins et al., 2004; "Complete Genomic Sequence of the Virulent <i>Salmonella</i> Bacteriophage SP6".
<i>group_6395</i>	Hypothetical protein	Sec1 super family; GIDA_assoc super family	Shippy et al., 2014; "tRNA modification enzymes GidA and MnmE: potential role in virulence of bacterial pathogens".
<i>group_6402</i>	Hypothetical protein	Abhydrolase_1 super family	Bahl et al., 2015; "Inhibiting an Epoxide Hydrolase Virulence Factor from <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Protects CFTR".
<i>group_6419</i>	Putative pilus subunit FilA	FilA domain	Harris et al., 2014; "Comparative genomics and transcriptomics to identify genetic mechanisms underlying the emergence of carbapenem resistant <i>Acinetobacter baumannii</i> (CRAb)".
<i>group_6507</i>	Hypothetical protein	IclR super family	Sun et al., 2014; "Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations".

- **A. junii:** Se identificaron 15 genes hábitat-específicos de cepas hospitalarias, de los cuales 5 genes están relacionados a factores de virulencia (3 genes relacionados a sistemas de secreción y transporte vesicular y 2 genes relacionados con la degradación de antibióticos beta-lactámicos (metalo- β -lactamasas).

- **A. soli:** Se identificaron 9 genes hábitatespecíficos de cepas hospitalarias, de los cuales 6 genes están relacionados a factores de virulencia (3 genes relacionados a mecanismos de defensa, 2 genes relacionados al moviloma y 1 gene involucrado en sistemas de extrusión).

- **A. radioresistens:** Se identificaron 5 genes hábitat-específicos de cepas hospitalarias, de los cuales 4 genes están relacionados a factores de virulencia involucrados en el moviloma.

- **A. johnsonii:** Se identificaron 15 genes hábitat-específicos de cepas hospitalarias, de los cuales 10 genes están relacionados a factores de virulencia (8 genes relacionados a

mecanismos de defensa, 1 gen relacionado a sistemas de secreción y transporte vesicular y 1 gen relacionado al moviloma).

- ***A. calcoaceticus***: Se identificaron 22 genes hábitat-específicos de cepas hospitalarias, de los cuales 13 genes están relacionados a factores de virulencia (5 genes relacionados a mecanismos de defensa, 4 genes relacionados al moviloma, 3 genes relacionados a sistemas de secreción y transporte vesicular y 1 gen relacionado en la motilidad).

La categoría con más genes que solamente se encuentran en cepas hospitalarias involucrados en la virulencia son los mecanismos de defensa (18 genes), la categoría con menos genes fue la asociada a la motilidad (1 gen), mientras que la categoría de sistemas de extrusión/transporte vesicular y el moviloma presentan 8 y 11 genes respectivamente.

Se realizó el mismo procedimiento para identificar los genes hábitat-específicos de las cepas ambientales. De los 88 genes hábitat-específicos ambientales, solamente se les asignó una categoría funcional COG a 45 genes (Anexo IV), los 43 genes restantes no cumplieron con el criterio del porcentaje del alineamiento (Anexo V).

De todos los genes presentes únicamente en aislados ambientales, 21 genes se relacionaron con factores de virulencia, los cuales se distribuyeron de la siguiente manera: 11 genes relacionados a mecanismos de defensa, 6 genes relacionados a sistemas de extrusión/transporte vesicular y 4 genes relacionados al moviloma.

Con el fin de identificar si todas las cepas hospitalarias comparten genes en común sin importar a qué especie pertenecen, se clasificaron en 2 grupos: las 29 cepas hospitalarias en uno y las 23 cepas ambientales en el otro. Se calculó el pangenoma y se utilizó la matriz de presencia y ausencia de genes. El script (materiales y métodos 5.9) se modificó de tal manera que nos identificara aquellos genes presentes en el grupo de las cepas hospitalarias y que estuvieran ausentes en el grupo de las cepas ambientales. Se realizó el mismo procedimiento, pero a la inversa para identificar los genes en común de todas las cepas ambientales.

El script se modificó de tal manera que se fue disminuyendo la cantidad de cepas hospitalarias, hasta encontrar aquellos genes compartidos por el mayor número de cepas de un grupo y ausente en el otro grupo, por ejemplo:

1. Identificación de genes presentes en **29** cepas clínicas y ausentes en todas las cepas ambientales = Cero, ningún gen. Disminución de 1 cepa.
2. Identificación de genes presentes en **28** cepas clínicas y ausentes en todas las cepas ambientales = Cero, ningún gen. Disminución de 1 cepa.
3. Identificación de genes presentes en **27, 26, 25...** cepas clínicas y ausentes en todas las cepas ambientales = Cero, ningún gen. Disminución de 1 cepa.
4. Se realizó el mismo procedimiento con las cepas ambientales.

No se identificaron genes que estuvieran presentes en las 29 cepas hospitalarias y ausentes en el grupo de las cepas ambientales. En el caso de las cepas ambientales ocurrió lo mismo, no se identificaron genes que estuvieran presentes en las 23 cepas ambientales y ausentes en todas las cepas hospitalarias.

Para el grupo de las 29 cepas hospitalarias, se identificaron solamente 5 genes compartidos entre 9 cepas clínicas pertenecientes a las especies de *A. johnsonii*, *A. junii* y *A. radioresistens* (Tabla 10). Las funciones de estos genes están relacionadas principalmente a la respuesta al estrés, como la exposición a metales pesados, drogas y radicales libres, a la formación de biopelícula y a la biosíntesis de antibióticos. En el caso del grupo de las 23 cepas ambientales, se identificaron solamente 4 genes compartidos entre 9 cepas ambientales pertenecientes a las especies *A. calcoaceticus*, *A. johnsonii* y *A. junii* (Tabla 11). Las funciones de estos genes están relacionadas con el metabolismo general y no se encuentran involucrados con factores de virulencia.

Tabla 10. Genes presentes en todos los aislados clínicos y ausentes en todos los aislados ambientales. Se agruparon las 29 cepas hospitalarias y las 23 cepas ambientales utilizadas en el estudio en 2 grupos. Se modificó el script (materiales y métodos 5.9) para identificar aquellos genes presentes en todas las cepas hospitalarias sin importar a que especie pertenecen. En recuadros rojos se indican aquellos genes relacionados a factores de virulencia.

Aislados clínicos de <i>Acinetobacter</i>				
Gene all	Annotation	COG code	COG number	Function
nema_2	N-ethylmaleimide reductase	C	COG1902	2- 4-dienoyl-CoA reductase or related NADH-dependent reductase, Old Yellow Enzyme (OYE) family.

Gene	Annotation	COG code	BLAST nr		Dominio conservado / Description
			% Cobertura	% Identidad	
group_3474	hypothetical protein	COG1476 (K)	81	59	HTH_XRE / XRE (Xenobiotic Response Element) family transcriptional regulator controls the expression of genes involved in stress response
		No COG in database	95	53	MqsA_antitoxin / MqsA_antitoxin is a family of prokaryotic proteins that act as antidotes to the mRNA interferase MqsR, this gene plays an essential role in biofilm regulation and cell signalling
group_3480	hypothetical protein	COG3224 (R)	51	60	ABM super family / Antibiotic biosynthesis monooxygenase, involved in the biosynthesis of several antibiotics by Streptomyces species.
group_3489	hypothetical protein	No COG in database	-	-	-
group_5225	hypothetical protein	COG3311 (K,X)	68	41	HTH_MerR-SF super family / MerR family transcription regulators have been shown to mediate responses to stress including exposure to heavy metals, drugs, or oxygen radicals in eubacterial and some archaeal species. They regulate transcription of multidrug/metal ion transporter genes and oxidative stress regulons
		No COG in database	74	37	HTH_XRE / XRE (Xenobiotic Response Element) family transcriptional regulator controls the expression of genes involved in stress response.

Tabla 11. Genes presentes en todos los aislados ambientales y ausentes en todos los aislados clínicos. Se agruparon las 23 cepas ambientales utilizadas en el estudio. Se modificó el script (materiales y métodos 5.9) para identificar aquellos genes presentes en todas las cepas ambientales sin importar a qué especie pertenecen.

Aislados ambientales de <i>Acinetobacter</i>				
Gene all	Annotation	COG code	COG number	Function
wbpB	UDP-N-acetyl-2-amino-2-deoxy-D-glucuronate oxidase	R	COG0673	Predicted dehydrogenase
epsL	Putative sugar transferase EpsL	M	COG2148	Sugar transferase involved in LPS biosynthesis (colanic teichoic acid)
calB_2	Coniferyl aldehyde dehydrogenase	C	COG1012	Acyl-CoA reductase or other NAD-dependent aldehyde dehydrogenase
wbpD	dideoxy-D-glucuronate N-acetyltransferase	R	COG0110	Acetyltransferase (isoleucine patch superfamily)

6.8 Lista de genes de virulencia de *Acinetobacter baumannii*

A la fecha no existe una base de datos que albergue todos los genes de virulencia identificados en *A. baumannii*, el patógeno más representativo del género *Acinetobacter*. Para este estudio se recopilaron 92 genes en formato multi-fasta (Anexo VI), reportados en artículos como factores asociados a virulencia en *A. baumannii*. Se realizó un alineamiento BLASTp de los 52 genomas de *Acinetobacter* utilizados en este estudio contra nuestra base de datos de genes de virulencia. El criterio que se utilizó para el alineamiento fue un 80% de identidad y un 60% de cobertura. Los genes que cumplían con los porcentajes asignados se indicaban como presentes en el genoma; por otra parte, se asignaban como ausentes si tienen valores menores a los porcentajes establecidos (Figura 17).

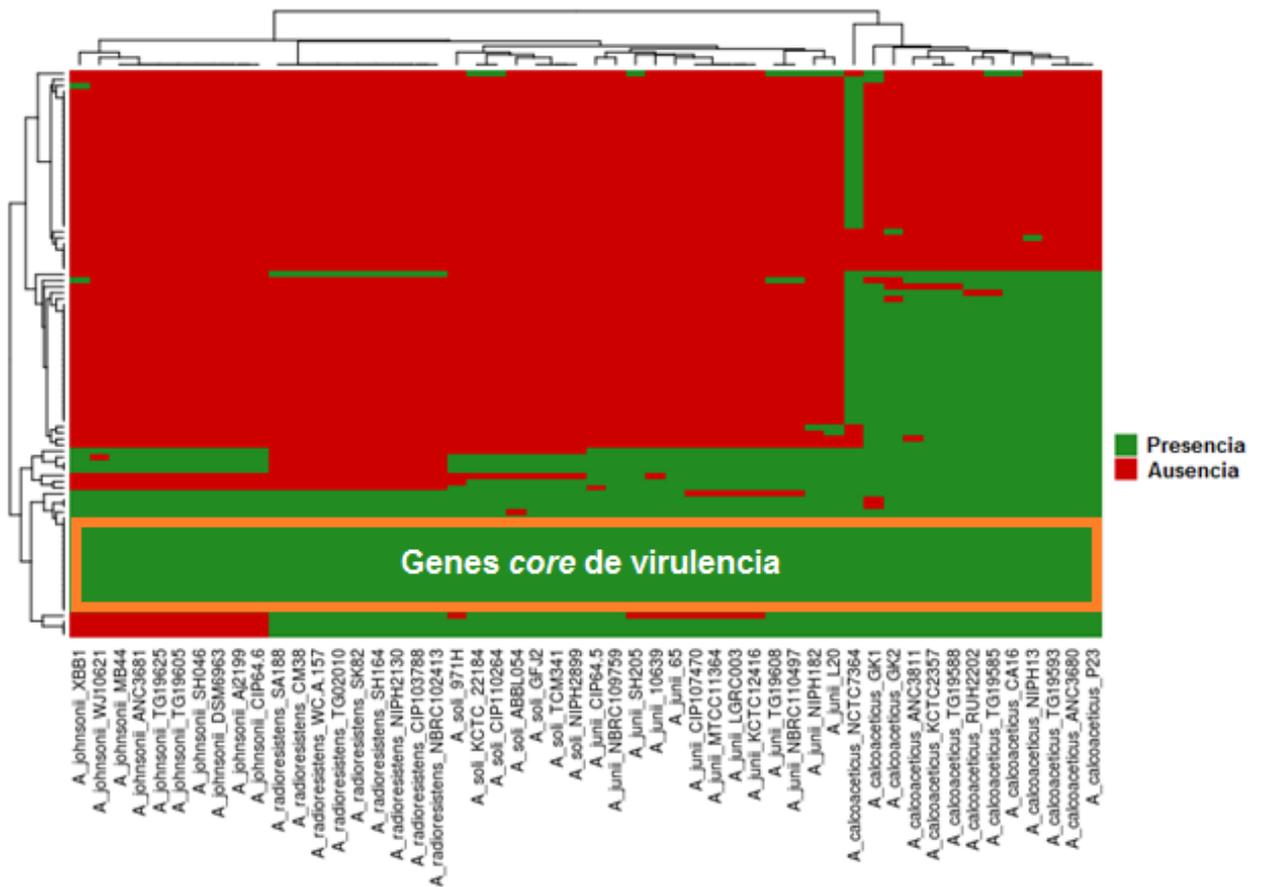


Figura 17. Mapa de calor de 92 genes asociados a virulencia en *A. baumannii*.

Se graficó la matriz de presencia y ausencia de 92 genes asociados a factores de virulencia en *A. baumannii* en los 52 genomas utilizados en el estudio. El color verde indica que el genoma presenta el gen, el color rojo indica la ausencia del gen en el genoma.

En la tabla 12 se enlista el *core* de genes presentes en los 52 genomas utilizados en el estudio asociados a factores de virulencia en *A. baumannii*. Independientemente de ser un aislado ambiental o nosocomial, se identificaron 16 genes en común, los cuales son necesarios y están implicados en las infecciones del torrente sanguíneo, en la persistencia en pulmones durante la neumonía, en la formación de biopelícula y adherencia, en el metabolismo del hierro, adquisición de zinc y en la reparación del ADN y adaptación al estrés. Decidimos añadir a la lista 3 genes debido a que se encuentran presentes en 51 genomas de un total de 52 aislados del género *Acinetobacter*. Estos 3 genes están involucrados en las infecciones del torrente sanguíneo, en la reparación del ADN, en la adaptación al estrés y en la adquisición de hierro.

Tabla 12. Genes compartidos por todas las cepas de *Acinetobacter* utilizadas en el estudio asociados a factores de virulencia de *A. baumannii*.

Gen (16)	Protein ID	Description	Virulence
<i>feoB</i>	WP_001278225.1	Ferrous iron transporter B	Bloodstream infection
<i>ddc</i>	ABO12853.2	D-ala-D-ala-carboxypeptidase; penicillin-binding protein 5	Bloodstream infection
<i>purL</i>	ABO13002.2	Phosphoribosylformylglycinamide synthase	Persistence in lungs during pneumonia
<i>guaA</i>	ABO10615.2	GMP synthetase	Persistence in lungs during pneumonia
<i>ompA</i>	ABO13246.2	Outer membrane protein A	Biofilm formation and adherence
<i>bfmR</i>	AAX40744.1	Two-component system	Biofilm formation
<i>nfuA</i>	ABO11411.2	Iron transport protein	Iron metabolism and oxidative stress
<i>znuB</i>	ABO10626.2	High affinity Zn transport protein	Permease involved in Zinc acquisition
<i>zur</i>	ABO10628.2	Transcriptional repressor of Zn transport system (Fur family)	Zinc uptake regulator
<i>iscRSUA</i>	ABO12061.2	iscRSUA operon repressor	Increase the amount of cellular free iron
recombination and DNA repair	ABO10785.2	Recombination and DNA repair protein	Contribute to DNA repair and therefore may promote adaptation to stress-induced DNA damage
DNA strand exchange and recombination	ABO12389.2	DNA strand exchange and recombination protein	
Tyrosine recombinase	ABO10716.2	Site-specific tyrosine recombinase	Increase the exogenous DNA uptake potential in human serum
Integration host factor	ABO12000.2	Integration host factor beta subunit	
<i>gacA</i>	ADX01920.1	Response regulator GacA (Global antibiotic and cyanide control protein, LuxR/UhpA family)	Pilus synthesis, motility, biofilm formation, serum resistance, aromatic compound metabolism
<i>lipA</i>	KJG94176.1	Extracellular lipase, fatty acid metabolism	Colonization in bacteremia

Tabla 12.1. Genes asociados a factores de virulencia de *A. baumannii* presentes en 51 aislados de un total de 52 cepas de *Acinetobacter* utilizadas en el estudio.

Gen	Protein ID	Description	Virulence
<i>pntB</i>	WP_011858352.1	Pyridine nucleotide transhydrogenase subunit beta	Bloodstream infection
DNA-binding protein HU-beta	ABO12064.1	DNA-binding protein HU-beta	Contribute to DNA repair and therefore may promote adaptation to stress-induced DNA damage
<i>SecA</i>	KFC05107.1	preprotein translocase, SecA subunit	Iron acquisition

Una vez identificada la función de los 19 genes asociados a factores de virulencia, nos cuestionamos si estos genes son específicos del género *Acinetobacter* o si se encuentran presentes en otras bacterias patógenas. Mediante el ID de la proteína, se extrajo la secuencia de aminoácidos de la proteína y se realizó un alineamiento BLASTp

no redundante en NCBI (criterio: 70 % de cobertura, 40% de identidad), para identificar proteínas similares en otros organismos (Tabla 13).

Tabla 13. Identificación de los 19 genes core asociados a factores de virulencia de *Acinetobacter* en otros organismos.

Se realizó un alineamiento BLASTp no redundante en NCBI (criterio: 70 % de cobertura, 40% de identidad) de las 19 secuencias de proteínas asociadas a factores de virulencia en *A. baumannii*. Los géneros indicados en recuadros rojos pertenecen al grupo de patógenos “ESKAPE”, los recuadros amarillos indican pertenecer a la misma familia; Moraxellaceae. Los géneros que tienen un asterisco rojo indican que tienen especies patógenas, los asteriscos verdes indican que esas especies principalmente se encuentran en el ambiente.

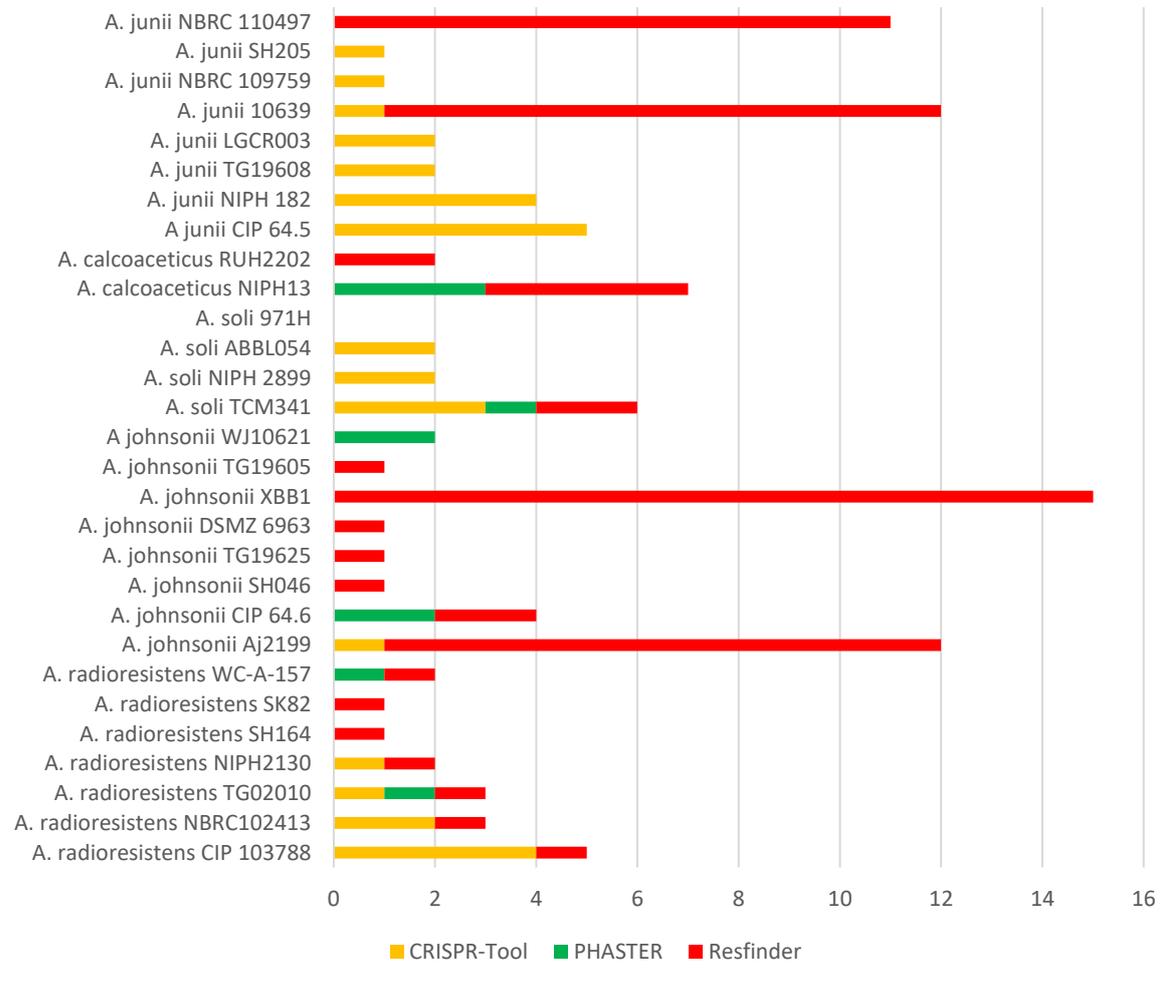
Género	Número de genes (Virulencia - <i>A. baumannii</i>)	Número de especies que presentan los genes de virulencia
Pseudomona	18	* 12 especies
Moraxella	16	* 9 especies
Psychrobacter	16	* 8 especies
Alkanindiges	14	* 2 especies
Enhydrobacter	11	* 2 especies
Perlucidibaca	6	* 2 especies
Halomona	4	* 3 especies
Stenotrophomonas	3	* 2 especies
Azotobacter	2	* 2 especies
Serratia	2	* 2 especies
Escherichia	2	* 1 especie
Neptuniibacte	2	* 2 especies
Alcanivorax	2	* 2 especies
Enterococcus	1	* 1 especie
Staphylococcus	1	* 1 especie
Klebsiella	1	* 1 especie

6.9 Presencia de secuencias CRISPR, fagos y genes de resistencia a antibióticos en genomas de aislados clínicos y ambientales de *Acinetobacter*

Debido a que comúnmente se menciona que la adquisición de genes de resistencia a los antibióticos favorece y permite a una cepa establecerse como patógeno nosocomial, se identificaron los genes de resistencia presentes en los 52 genomas de las cepas de *Acinetobacter* para comparar las cepas hospitalarias de las ambientales. Debido que una manera de adquirir genes de resistencia es mediante la incorporación de ADN mediante bacteriófagos (transducción), se identificó la presencia de fagos en todos los genomas bacterianos, analizando si existe una relación proporcional con los genes de resistencia presentes en cada cepa.

Por último, los sistemas CRISPR/Cas se consideran como un sistema inmune adquirido bacteriano que confiere resistencia a elementos externos de ADN como plásmidos y fagos. Los espaciadores de los CRISPR reconocen secuencias específicas y guían a las nucleasas Cas para cortar y degradar los elementos génicos exógenos. Debido a que una manera de adquirir genes de resistencia es a través de mecanismos de transferencia horizontal de genes, se identificaron las secuencias CRISPR/Cas presentes en todos los genomas de *Acinetobacter* para analizar si el número de secuencias CRISPR/Cas presentes en un genoma pueden haber influido en la adquisición de genes de resistencia. El razonamiento es que entre más secuencias CRISPR/Cas tenga un genoma bacteriano, más espaciadores actuarán como mecanismos de defensas y reconocerán secuencias exógenas y los degradarán evitando la incorporación de genes, entre ellos los de resistencia. Los genomas de *Acinetobacter* se agruparon en cepas hospitalarias y cepas ambientales; los resultados de la identificación de genes de resistencia, secuencias CRISPR/Cas y presencia de fagos en los genomas se graficaron en la figura 18.

Cepas Hospitalarias



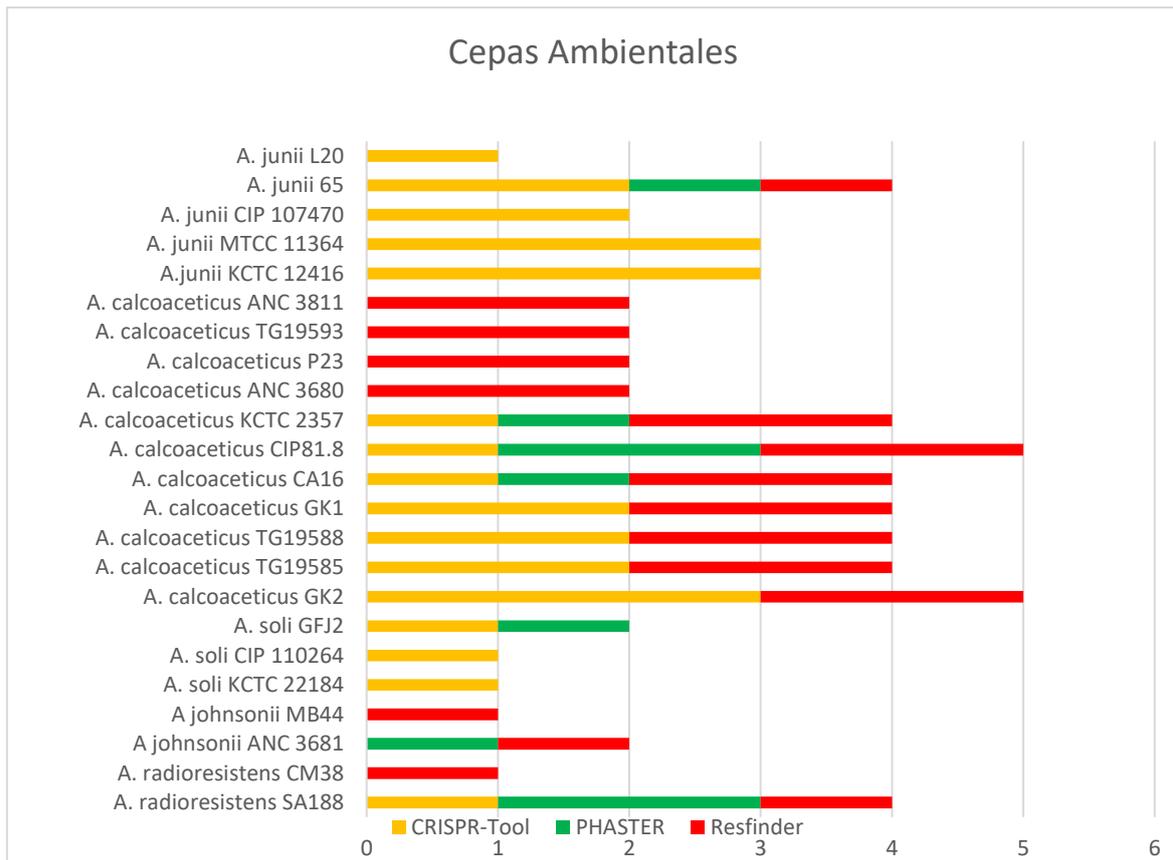


Figura 18. Presencia de secuencias CRISPR, fagos y genes de resistencia a antibióticos en genomas de aislados clínicos y ambientales de *Acinetobacter*.

Se identificaron los genes de resistencia (color rojo), las secuencias palíndromas repetidas inter-espaciadas CRISPR (color amarillo) y las secuencias de profagos (color verde) presentes en los 52 genomas utilizados en el estudio. Los patrones obtenidos de estas 3 secuencias en los genomas de aislados clínicos y ambientales son muy variados. No existe una relación proporcional evidente entre el número de secuencias CRISPR y secuencias de profagos, con el número de genes de resistencia a los antibióticos.

En los resultados podemos observar que los aislados clínicos tienen un mayor número de genes de resistencia a los antibióticos en comparación con los aislados ambientales. Se clasificaron de la siguiente forma: *A. johnsonii* XBB1 (EDR, 15 genes de resistencia), *A. junii* NBRC 110497 y *A. junii* 10639 (MDR, 11 genes de resistencia y *A. johnsonii* Aj2199 (MDR, 12 genes de resistencia). En contraste, el máximo número de genes de resistencia presente en los aislados ambientales fueron 2 genes. No se identificó la presencia de fagos en los genomas de las 4 cepas con mayor número de genes de resistencia a los antibióticos, y en caso de tener secuencias CRISPR/Cas, solamente se identificó una secuencia.

Intentar correlacionar la presencia de fagos y secuencias CRISPR/Cas en los genomas con tener un mayor número de genes de resistencia es complicado, ya que estas proporciones son muy diversas en los genomas de aislados clínicos y ambientales de *Acinetobacter*. No se cumple la regla en todos los casos de que un menor número de secuencias CRISPR/Cas y un mayor número de fagos presentes en el genoma, determinen una mayor adquisición de genes de resistencia.

Una vez identificados los genes de resistencia en los 52 genomas de *Acinetobacter*, se realizó un alineamiento contra los 3 grupos de genes obtenidos del pangenoma (genoma *core*, genoma accesorio y genes únicos, resultados sección 6.7) para identificar en qué grupo predominan los genes de resistencia (Tabla 14).

Tabla 14. Identificación de genes de resistencia a los antibióticos en el genoma *core*, genoma accesorio y genes únicos de las 5 especies de *Acinetobacter*.

Una vez obtenidas las secuencias de los genes de resistencia a los antibióticos (ResFinder), se realizó un alineamiento BLASTn contra los 3 grupos de genes obtenidos del pangenoma (genoma *core*, genoma accesorio y genes únicos) para identificar en qué grupo predominan los genes responsables a la resistencia de los antibióticos. El porcentaje de identidad del alineamiento se anotó en la tabla y se colorearon los genes de acuerdo a qué grupo de genes corresponden.

Grupos de genes	
■	Accesorio Hospital
■	Accesorio Ambiental
■	Core Ambiental
■	Core Hospital
■	Únicos Hospital
■	Únicos Ambiental

Acinetobacter junii		Aislados Nosocomiales								Aislados Ambientales				
Antibiotic Resistance	Resistance gene	NBRC110 497	10639	SH205	NIPH 182	CIP 64.5	TG19 608	NBRC 10975	LRGC 003	65	KCTC 12416	CIP107 470	MTCC 11364	L20
Aminoglycoside	<i>aadA1</i>	100,00%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>aadA2</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	100,00%	-	-	-	-
	<i>aadB</i>	100,00%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>aacA4</i>	99,82%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>aac(6)-31</i>	-	85,77%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>aac(3)-IIa</i>	-	100,00%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>aph(3)-VIa</i>	98,46%	100,00%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>strA</i>	-	100,00%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Beta-lactam	<i>blaIMP-1</i>	99,87%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>blaIMP-18</i>	-	99,87%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>blaOXA-58</i>	100,00%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>blaTEM-1B</i>	-	100,00%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Macrolide, Lincosamide and Streptogramin B	<i>mph(E)</i>	100,00%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>msr(E)</i>	100,00%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Phenicol	<i>catB8</i>	94,93%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulphonamide	<i>sul1</i>	100,00%	100,00%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>sul2</i>	-	100,00%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fluoroquinolone	<i>aac(6)Ib-cr</i>	99,42%	99,40%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tetracycline	<i>tet(X)</i>	-	94,73%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Acinetobacter soli		Aislados Nosocomiales				Aislados Ambientales		
Antibiotic Resistance	Resistance gene	TCM341	NIPH2899	ABBL054	971H	CIP1102 64	KCTC22 184	GFJ20
Aminoglycoside	<i>aph(3)-VIa</i>	98,46%	-	-	-	-	-	-
Beta-lactam	<i>blaNDM-1</i>	100,00%	-	-	-	-	-	-

A. calcoaceticus		Aislados Nosocomiales				Aislados Ambientales								
Antibiotic Resistance	Resistance gene	NIPH 13	RUH2202	ANC 3680	CIP 81.1	ANC 3811	TG195 93	TG1958 5	TG1958 8	P23	KCTC 2357	GK1	GK2	CA16
Beta-lactam	<i>blaADC-25</i>	86,52%	86,70%	86,61%	86,61%	89,76%	86,16%	86,70%	86,61%	85,98%	86,61%	86,70%	86,46%	86,16%
	<i>blaOXA-328</i>	97,81%	97,81%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>blaTEM-1A</i>	100,00%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>blaOXA-326</i>	-	-	97,57%	-	91,85%	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>blaOXA-348</i>	-	-	-	-	-	99,51%	-	-	-	-	-	-	-
	<i>blaOXA-330</i>	-	-	-	-	-	-	97,45%	-	-	-	97,45%	-	-
	<i>blaOXA-213</i>	-	-	-	100,00%	-	-	-	100,00%	97,57%	100,00%	-	-	-
	<i>blaOXA-359</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	96,35%	-
Glycopeptide	<i>VanS-D</i>	95,81%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	97,81%

<i>A. johnsonii</i>		Aislados Nosocomiales								Aislados Ambientales	
Antibiotic Resistance	Resistance gene	XBB1	Aj2199	CIP 64.6	SH046	TG1960 5	TG1962 5	DSMZ 6963	WJ10 621	MB44	ANC 3681
Aminoglycoside	<i>aacA4</i>	99,82%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>aph(3')-VIa</i>	100,00%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>aac(3)-IIId</i>	99,88%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>strA</i>	100,00%	100,00%	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>strB</i>	100,00%	100,00%	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>aph(3')-IIa</i>	-	-	99,37%	-	-	-	-	-	-	-
	<i>aac(3)-IIa</i>	-	100,00%	-	-	-	-	-	-	-	-
Beta-lactam	<i>blaOXA-333</i>	96,36%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>blaPER-1</i>	100,00%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>blaPER-2</i>	-	100,00%	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>blaOXA-58</i>	100,00%	100,00%	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>blaOXA-211</i>	-	-	-	94,30%	-	-	-	-	-	96,26%
	<i>blaOXA-309</i>	-	-	97,33%	-	97,33%	97,33%	97,33%	-	96,61%	-
	<i>blaOXA-212</i>	-	95,27%	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>blaTEM-1B</i>	-	100,00%	-	-	-	-	-	-	-	-
Fluoroquinolone	<i>aac(6)/b-cr</i>	99,42%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Macrolide, Lincosamide and Streptogramin B	<i>mph(E)</i>	100,00%	100,00%	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>msr(E)</i>	100,00%	99,93%	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>ere(A)</i>	-	100,00%	-	-	-	-	-	-	-	-
Rifampicin	<i>ARR-3</i>	100,00%	-	-	-	-	-	-	-	-	
Sulphonamide	<i>sul1</i>	100,00%	100,00%	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>sul2</i>	100,00%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tetracycline	<i>tet(Y)</i>	100,00%	-	-	-	-	-	-	-	-	-

<i>A. radioresistens</i>		Aislados Nosocomiales							Aislados Ambientales	
Antibiotic Resistance	Resistance gene	TG02010	SH164	NIPH 2130	SK82	WC-A-157	CIP 103788	NBRC 102413	CM38	SA188
Beta-lactam	<i>blaOXA-23</i>	100,00%	99,03%	100,00%	98,30%	98,54%	-	-	98,54%	-
	<i>blaOXA-133</i>	-	-	-	-	-	99,27%	99,27%	-	99,88%

Los genes de resistencia predominan en los grupos de genes únicos y genes accesorios hospitalarios, mientras que el grupo que contiene menos genes de resistencia a los antibióticos es el genoma *core*, tanto de aislados clínicos como ambientales.

A. calcoaceticus fue la única especie que presentó un gen intrínseco responsable de la resistencia a beta-lactámicos, el gen *blaADC-25* se identificó en todas las cepas sin importar si eran aislados clínicos o ambientales. Por tal motivo, fue el único gen presente en el grupo de genes *core*, lo que nos indica que en las 5 especies de *Acinetobacter* los genes de resistencia no tienden a ser intrínsecos de la especie y muy probablemente los adquieren mediante eventos de transferencia horizontal de genes. Afortunadamente, solo una cepa de *Acinetobacter* presenta el gen Nueva Delhi Metalobetalactamasa-1 (NDM-1), responsable de la resistencia a diversos

carbapenémicos utilizados para combatir las infecciones causadas por las bacterias Gram-negativas MDR.

7. Discusión y conclusiones

Las especies del género *Acinetobacter* son organismos omnipresentes en la naturaleza y tienen la habilidad de ocupar diferentes nichos ecológicos. Se pueden aislar de cuerpos de agua, de la tierra, de animales y de humanos. Con el advenimiento de las estrategias de secuenciación masiva se han descubierto nuevas especies del género *Acinetobacter* y a la fecha (noviembre, 2017), el género ahora contiene 53 especies con nombres validados y publicados. Solamente una fracción de estas especies es la responsable de hasta el 90% de los brotes epidemiológicos hospitalarios cuando se trata de infecciones causadas por *Acinetobacter*. Debido a que son especies estrechamente relacionadas se agrupan dentro de un mismo complejo llamado ACB (*A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. pittii*, *A. seifertii*, *A. nosocomialis* y *A. dijksboorniae*) y el control de las infecciones adquiridas en los hospitales por especies pertenecientes a este complejo es una de las principales preocupaciones a nivel mundial.

Acinetobacter baumannii es el representante más importante del género por ser un formidable patógeno nosocomial, de difícil control y tratamiento, dado el rango de antibióticos al que ahora es resistente (Peleg *et al.*, 2008). La OMS la considera como la especie más peligrosa del género *Acinetobacter* y pertenece a un grupo de patógenos nosocomiales de suma importancia médica llamados “ESKAPE”, para los cuales urge profundizar nuestros conocimientos sobre los mecanismos de virulencia, de resistencia a los antibióticos, de patogenicidad y de transmisión, para poder desarrollar nuevas opciones terapéuticas (Pendleton *et al.*, 2013). Los mecanismos de resistencia a diversos antimicrobianos utilizados por los patógenos del grupo ESKAPE, incluyen la inactivación enzimática de la droga, la modificación del sitio de unión al blanco de la droga, cambios en la permeabilidad de la célula mediante la pérdida de porinas o el incremento en la expresión de bombas de extrusión y la protección física proporcionada por la formación de biopelícula (Santajit & Indrawattana, 2016).

La mayor amenaza para los sistemas de salud pública a nivel global es la resistencia antimicrobiana. El uso excesivo y la prescripción inapropiada de medicamentos, aunado al uso de antibióticos en la producción animal, ha generado bacterias *MDR*, *PDR*, y *EDR* las cuales son la principal causa de infecciones nosocomiales y mortandad en el mundo (Clark *et al.*, 2016). Debido a que una de las principales preocupaciones por parte de las cepas epidémicas de *A. baumannii* es la velocidad con la que adquieren resistencias a diversos antibióticos, la mayoría de los análisis de comparación de secuencias de genomas de patógenos nosocomiales de cepas de *Acinetobacter*, se enfocan en la evaluación de la resistencia antimicrobiana, dejando a un lado las especies que no pertenecen al complejo ACB y como consecuencia, existen pocos estudios disponibles sobre las características de virulencia que establezcan a estos organismos como potenciales patógenos emergentes en hospitales.

Los métodos fenotípicos que se utilizan comúnmente en los hospitales como VITEK02, Microscan y MALDI-TOF son razonablemente buenos para identificar al género *Acinetobacter*, sin embargo, son limitados y no pueden identificar correctamente a las diferentes especies dentro del complejo *calcoacético-baumannii* y a otras especies relacionadas con este complejo. Por tal motivo, la identificación errónea a nivel de especie es muy común. En este estudio comprobamos que utilizando métodos de tipificación más precisos como el análisis filogenético del gen *rpoB* y el cálculo de la identidad nucleotídica promedio (ANI), se pueden clasificar de manera correcta los aislados clínicos a nivel de especie. El algoritmo del ANI mide la similitud que tienen las regiones homólogas de dos genomas diferentes y en todas las muestras se obtuvieron valores mayores al 97% de similitud entre las cepas de la misma especie. Mediante el cálculo del ANI y el análisis filogenético del gen *rpoB* se confirmó que las 52 cepas de *Acinetobacter* utilizadas en el estudio tienen una clasificación taxonómica correcta. Por otra parte, un ejemplo de la clasificación imprecisa a nivel de especie en hospitales, son las 3 cepas mexicanas analizadas en este estudio, que en un inicio fueron rotuladas como *A. baumannii*, pero al analizarlas se descubrió que son especies que no pertenecen al complejo ACB; en México existen pocos reportes de casos de infecciones nosocomiales por especies de *A. junii* y *A. soli*.

Inclusive hay especies en base de datos como NCBI que tienen una clasificación taxonómica errónea, sobre todo aquellas depositadas hace varios años. Pero gracias a

los análisis realizados en este estudio, se identificaron 6 cepas con una errónea clasificación y se logró reubicarlas a la especie que pertenecen.

Mediante un perfil de plásmidos confirmamos que el número de plásmidos de las cepas de *Acinetobacter* es muy diverso. Identificamos que la cepa *A. junii* LRGC003 no contiene plásmidos, mientras que la cepa *A. junii* 10639 tiene 1 plásmido de un tamaño aproximado de 0.5 Mb y la cepa *A. soli* 971H tiene 6 plásmidos de diversos tamaños. Es común referirse a los plásmidos como los responsables de conferir alguna ventaja selectiva a las bacterias para colonizar diferentes nichos y sobrevivir a condiciones específicas del ambiente. La persistencia de las cepas del ACB se ha relacionado con la resistencia a los antibióticos; muchas veces relacionamos que si una bacteria tiene muchos plásmidos será capaz de resistir a diversos antibióticos por contener genes de resistencia. Sin embargo, muchos de los aislados clínicos de *Acinetobacter* poseen pocos plásmidos, e incluso en ocasiones ninguno, lo que indica que la mayor parte de los genes que les permiten a estas bacterias sobrevivir en el ambiente hospitalario es de origen cromosomal.

Para ensamblar los genomas, no existe un ensamblador maestro que obtenga siempre los mejores resultados, depende mucho de cada muestra a secuenciar y el mayor problema a resolver es la gran cantidad de secuencias repetidas presentes en los genomas de *Acinetobacter*, los cuales al secuenciar únicamente con tecnología Illumina suelen obtener un alto número de *contigs*.

Gracias a los avances tecnológicos y a la implementación de técnicas moleculares en la tipificación bacteriana, se han incrementado los reportes de infecciones nosocomiales, a nivel mundial, de especies que no pertenecen al complejo ACB, como lo son: *A. bereziniae*, *A. guillouiae*, *A. haemolyticus*, *A. johnsonii*, *A. junii*, *A. lwoffii*, *A. parvus*, *A. radioresistens*, *A. schindleri*, *A. soli* y *A. ursingii* (Dijkshoorn *et al.*, 2007). Estas especies usualmente se clasifican erróneamente como *A. baumannii*, por ello se desconocen su virulencia, su patogenicidad y su real impacto en la salud humana. Se desconoce también si en unos años estos microorganismos se convertirán en un problema de salud pública a nivel global, por lo cual fue de nuestro interés identificar aquellos genes relacionados a factores de virulencia para cada especie y así, poder evaluar el potencial que tienen como patógenos nosocomiales.

En este trabajo nos enfocamos en identificar el genoma *core*, los genes accesorios y genes únicos de 5 especies de *Acinetobacter* que tienen disponibles genomas secuenciados de aislados clínicos y ambientales (*A. calcoaceticus*, *A. junii*, *A. soli*, *A. radioresistens* y *A. johnsonii*) para realizar un análisis de genómica comparativa y poder identificar aquellos genes que solamente se encuentran presentes en aislados clínicos y están asociados a factores de virulencia, que posiblemente les favorecen para establecerse en los hospitales.

Se determinó la función general de cada uno de los elementos que conforman el pangenoma de las 5 especies de *Acinetobacter*, asignándolos a una categoría COG. Hicimos énfasis en analizar aquellas categorías relacionadas a factores de virulencia (**V**= Mecanismos de defensa, **N**= Motilidad, **U**= Sistemas de Secreción, **X**= Moviloma) y se identificó un total de 4,520 genes. Los aislados clínicos demostraron tener una mayor cantidad de genes dentro de las categorías V, N, U y X en comparación con los aislados ambientales, teniendo 2,666 y 1,854 genes respectivamente.

La categoría que contiene más genes entre las 5 especies de *Acinetobacter* es la categoría del moviloma con 2,208 genes, distribuidos de la siguiente manera: 763 genes de aislados ambientales y 1,445 genes de aislados clínicos. El mejor ejemplo para contrastar es *A. calcoaceticus*, el cual es primordialmente una especie ambiental y tiene solamente 102 genes asociados al moviloma, mientras que *A. johnsonii* y *A. junii* que comúnmente se encuentran en aislados hospitalarios, son las cepas que mayor cantidad de genes tienen al contener 767 y 875 genes respectivamente, es decir, contienen más de 7.5 veces el número de genes asociados al moviloma con respecto a la especie ambiental. Este dato es interesante debido a que comúnmente los genes de resistencia se encuentran asociados a integrones, transposones y elementos conjugativos e integrativos, los cuales se pueden propagar por mecanismos de transferencia horizontal de genes, generando resistencias en las cepas receptoras limitando nuestras opciones para tratar las infecciones.

Debido a que los genes del moviloma están sobrerrepresentados en la mayor parte de las especies de nuestro estudio, menos en *A. calcoaceticus*, identificamos si estos genes están presentes en el genoma *core*, en el genoma accesorio o en los genes únicos de las especies. El grupo de genes que predomina al tener mayor cantidad de genes relacionados al moviloma, es el grupo de genes únicos hospitalarios. El hecho de

que los genes relacionados a factores de virulencia dentro de las categorías V, N, U, y X no estuvieran representados en mayor cantidad en el genoma *core* de las especies, nos da argumentos para decir que cada especie utiliza estrategias diferentes para establecerse como patógeno oportunista en los hospitales. Confirmamos mediante un análisis filogenético basado en SNPs de los genes *core*, que cambios puntuales en este grupo de genes no determina o favorece que una cepa obtenga una ventaja para establecerse en nosocomios. Inclusive, identificamos si existen genes en común compartidos en todos los aislados clínicos y que estuvieran ausentes en los aislados ambientales, de los cuales no se identificaron genes en común. Solamente 9 cepas clínicas de un total de 29 aislados hospitalarios comparten un *core* de 5 genes, que a pesar de estar involucrados en la formación de biopelícula, en la biosíntesis de antibióticos y en la respuesta al estrés, como la exposición a metales pesados, drogas y radicales libres, son muy pocos genes compartidos por muy pocas cepas de diferentes especies. Si estos genes fueran esenciales para establecerse en nosocomios, estarían representados en mayor proporción en aislados clínicos.

En nuestro análisis se identificaron 66 genes que solamente se encuentran presentes en cepas de aislados nosocomiales y ausentes en aislados ambientales, de los cuales 38 de ellos se ha reportado que juegan algún papel involucrado en virulencia. La categoría con más genes de virulencia son los mecanismos de defensa (18 genes), la categoría con menos genes fue la asociada a la motilidad (1 gen), mientras que la categoría de sistemas de extrusión/transporte vesicular y el moviloma presentan 8 y 11 genes respectivamente. Por otro lado, se identificaron 3 veces menos genes relacionados con factores de virulencia en los aislados ambientales, los cuales se distribuyeron de la siguiente manera: 11 genes relacionados a mecanismos de defensa, 6 genes relacionados a sistemas de extrusión/transporte vesicular y 4 genes relacionados al moviloma. Es un hecho que las bacterias, independientemente del hábitat donde se encuentren, necesitan estos genes para lidiar con el estrés del ambiente y poder sobrevivir. Lo interesante es que, en todos los casos, los aislados hospitalarios presentan en mayor cantidad genes relacionados a factores de virulencia, lo que nos da indicios para argumentar que es un evento significativo de preadaptación muy eficiente para establecerse en ambientes hospitalarios.

Se realizó una base de datos de factores de virulencia reportados en artículos de A.

baumannii. Recopilamos un total de 92 genes y buscamos la presencia de estos genes en los 52 genomas utilizados en el estudio. Las 5 especies de *Acinetobacter* comparten la presencia de 16 genes involucrados principalmente en infecciones del torrente sanguíneo, persistencia en pulmones durante neumonía, formación de biopelículas y la adquisición de hierro y de zinc. Debido a que las cepas de aislados ambientales presentan genes relacionados a infecciones nosocomiales y tienen un número similar de genes asignados a mecanismos de defensa, secreción y motilidad en comparación con las cepas de aislados hospitalarios, esto nos da argumentos para decir que tienen genes intrínsecos a la especie que los convierte en organismos potenciales para ser un problema de salud pública. *A. calcoaceticus* fue la especie que presentó más genes de virulencia identificados en *A. baumannii* (50 genes de 92), lo cual tiene sentido porque esta especie pertenece al complejo ACB y son estrechamente relacionadas.

Decidimos identificar la presencia de fagos en los genomas de *Acinetobacter* debido a que es una forma de adquirir genes de resistencia; por otro lado nos interesó identificar las secuencias CRISPR/Cas debido a que se ha demostrado en otras especies, como *E. coli*, *Enterococcus faecium* y *Staphylococcus aureus*, que el tener un menor número o ausencia de secuencias CRISPR/Cas, favorece la virulencia de la bacteria como la resistencia a los antibióticos (Louwen *et al.*, 2014).

En el caso de las especies de *Acinetobacter*, no se encontró alguna relación proporcional evidente entre el número de fagos y secuencias CRISPR/Cas presentes en el genoma con respecto a tener una mayor resistencia a los antibióticos. De nuestras muestras clínicas, solamente la cepa *A. junii* 10639 se puede clasificar como una bacteria EDR debido a que tiene genes de resistencia correspondientes a 5 familias de antibióticos: aminoglucósidos, beta-lactamasas, fluoroquinolonas, sulfonamidas y tetraciclinas. Se ha reportado la detección de cepas MDR de aislados clínicos de *A. soli* en Europa y Asia, pero no de *A. junii*. Afortunadamente, la cepa *A. junii* LRGC003 y *A. soli* 971H aún no presentan genes de resistencia a los antibióticos.

Los carbapenémicos son los medicamentos más efectivos utilizados para combatir las infecciones causadas por las bacterias Gram-negativas MDR, sin embargo, existen reportes de cepas emergentes capaces de producir carbapenemasas, las cuales son enzimas β -lactamasas que pueden hidrolizar carbapenémicos, penicilinas y cefalosporinas e inhibir su función. Las β -lactamasas se pueden clasificar en 4 grupos

principales en el esquema Ambler de acuerdo a su estructura molecular.

El grupo Ambler de clase A contiene enzimas β -lactamasas de espectro extendido (ESBLs) principalmente TEM, SHV, tipo CTX y KPCs. En los 52 genomas de *Acinetobacter* solamente se identificaron 3 genes pertenecientes a este grupo, identificados exclusivamente en aislados clínicos. El gen *blaTEM-1B* se encuentra presente en *A. junii* 10639 y *A. johnsonii* Aj2199, mientras que el gen *blaTEM-1A* se encuentra presente en *A. calcoaceticus* NIPH13. Las enzimas del grupo B incluyen metalo- β -lactamasas (MBLs) las cuales requieren al Zn^{2+} como cofactor. Los genes que codifican MBL se encuentran en plásmidos, por lo tanto, fácilmente se transfieren a otros microorganismos. Los MBL más comunes son la imipenemasa metalo- β -lactamasa (IMP), el integron Verona metalo- β -lactamasa (VIM) y la enzima descrita recientemente, Nueva Delhi metalo- β -lactamasa -1 (NDM-1). Se identificaron 3 genes pertenecientes a este grupo, exclusivamente en aislados clínicos. El gen *IMP-1* se encuentra presente en el genoma de *A. junii* NBRC110497 y el gen *IMP-18* se identificó en *A. junii* 10639. Afortunadamente, *A. soli* TCM341 fue la única cepa de *Acinetobacter* que presenta el gen *blaNDM-1*.

El grupo de enzimas de clase C incluye las enzimas penicilinasas y cefalosporinasas, como la β -lactamasa AmpC, no se identificaron genes pertenecientes a este grupo en nuestros genomas analizados. Por último, el grupo de enzimas de clase D consiste en enzimas carbapenemasas tipo-OXA, las cuales hidrolizan la oxacilina. Se encuentran comúnmente en especies de *Acinetobacter* y confieren una alta resistencia a los carbapenémicos. Se identificaron un total de 15 genes tipo-OXA presentes tanto en cepas clínicas como ambientales. Las especies que presentaron un mayor número de genes tipo-OXA son *A. calcoaceticus* y *A. johnsonii*, se identificaron 7 y 5 genes respectivamente.

En México se han realizado pocos estudios de vigilancia epidemiológica; los primeros estudios se realizaron en el año 2003 pero los datos fueron inconclusos debido a la insuficiente cantidad de muestras. En el año 2010 se registraron los primeros casos de infecciones por organismos MDR de *A. baumannii*, y fue así como a partir del año 2010 se incrementaron los programas de control, prevención y de vigilancia en nuestro país, principalmente en Monterrey, Guadalajara, Ciudad de México, y San Luis Potosí. Tan

solo 2 años después, en el año 2012 un estudio a nivel nacional reveló que el 16.7% de los aislados clínicos de *A. baumannii* eran resistentes a imipenémicos, encendiendo las alarmas en los hospitales mexicanos (Gonzalez-Villoria & Valverde-Garduño, 2016).

Este es el primer estudio realizado con especies de *Acinetobacter* donde se analizan los genomas de aislados clínicos y ambientales de especies que no pertenecen al complejo ACB. En general los aislados clínicos presentan mayor cantidad de genes relacionados a factores de virulencia, en especial los asociados al moviloma. Todas las cepas, sin importar el hábitat donde se encuentran, presentan genes intrínsecos asociados a factores de virulencia identificados en *A. baumannii*, lo que indica la existencia de un *core* de genes intrínseco a la especie que les favorece su persistencia en fómites, en las infecciones hospitalarias de pacientes inmunodeprimidos y su establecimiento en los nosocomios. Se necesitan implementar nuevos programas de vigilancia epidemiología y promover investigación en los mecanismos de patogenicidad y transmisión de especies de *Acinetobacter* para comprender los factores de virulencia implicados en las infecciones nosocomiales y crear nuevas opciones terapéuticas para resolver este problema a nivel mundial.

8. Perspectivas

- Analizar el contexto genético de los genes presentes únicamente en aislados clínicos (vecinos y co-ocurrentes).
- Debido a que las cepas hospitalarias presentan un mayor número de genes asociados al moviloma que las cepas ambientales, nos interesaría identificar que otros genes se encuentran asociados al moviloma en las cepas hospitalarias.

9. BIBLIOGRAFÍA:

Aziz, R., K., Bartels, D., Best, A., A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R., A., Zagnitko, O. (2008). **The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology.** *BMC Genomics*, 9, 75.

Al Atrouni, A., Joly-Guillou, M., L., Hamze, M., Kempf, M. (2016). **Reservoirs of Non-*baumannii* *Acinetobacter* Species.** *Frontiers in Microbiology*, 7, 49.

Ahmed, S., S. & Alp, E. (2015). **Genotyping methods for monitoring the epidemic evolution of *A. baumannii* strains.** *The Journal of Infection in Developing Countries*, 9(4), 347-354.

Bartual, S., G., Seifert, H., Hippler, C., Luzon, M., A., Wisplinghoff, H., Rodríguez-Valera, F. (2005). **Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*.** *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 4382–4390.

Baumann, P., Doudoroff, M., Stanier, R., Y. (1968). **A Study of the *Moraxella* Group II. Oxidative-negative Species (Genus *Acinetobacter*).** *Journal of Bacteriology*, 95(5), 1520–1541.

Behjati, S., & Tarpey, P., S. (2013). **What is next generation sequencing?** *Archives of Disease in Childhood. Education and Practice Edition*, 98(6), 236–238.

Bergogne-Berezin, E. & Towner, K., J. (1996). ***Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features.** *Clinical microbiology reviews*, 9(2), 148.

Bi, D., Xu, Z., Harrison, E., M., Tai, C., Wei, Y., He, X., Jia, S., Deng, Z., Rajakumar, K., Ou, H., Y. (2012). **ICEberg: a web-based resource for integrative and conjugative elements found in Bacteria.** *Nucleic Acids Research*, 40:D621–D626.

Brisou, J., Prevot A., R. (1954). **Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under *Acromobacter* group.** *Annales De l'Institut Pasteur*, 86(6):722-8.

Burrus, V., Waldor, M., K. (2004). **Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements.** *Research in Microbiology*, 155(5): 376-386.

Chatterjee, S., Mondal, A., Mitra, S., Basu, S. (2017). ***Acinetobacter baumannii* transfers the bla_{NDM-1} gene via outer membrane vesicles.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 72(8): 2201-2207.

Chen, L., Xiong, Z., Sun, L., Yang, J., Jin, Q. (2012). **VFDB 2012 update: toward the genetic diversity and molecular evolution of bacterial virulence factors.** *Nucleic Acids Research*, 40(Database issue), D641–D645.

Clark, N., M., Zhanel, G., G., Lynch, J., P. (2016). **Emergence of antimicrobial resistance among *Acinetobacter* species: a global threat.** *Current Opinion in Critical Care*, 22(5):491–9.

Cosgaya, C., Mari-Almirall, M., Van Assche, A., Fernandez-Orth, D., Mosqueda, N., Telli, M., Huys, G., Higgins, P. G., Seifert, H., Lievens, B., Roca, I., Vila, J. (2016). ***Acinetobacter* *dijkshoorniae* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex mainly recovered from clinical samples in different countries.** *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(10): 4105-4111.

D'Costa, V., M., McGrann, K., M., Hughes, D., W., Wright, G., D. (2006). **Sampling the antibiotic resistome.** *Science*, 311: 374–377.

Dijkshoorn, L., Nemec, A., Seifert, H. (2007). **An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*.** *Nature Reviews Microbiology*, 5(12):939-951.

Di Nocera, P., P., Rocco, F., Giannouli, M., Triassi, M., Zarrilli, R. (2011). **Genome organization of epidemic *Acinetobacter baumannii* strains.** *BMC Microbiology*, 11: 224.

Di Pierro, F. (2015). **Antibiotic resistance. A role for nutraceuticals?** *Nutrafoods* 14:57-61.

Dolzani, L., Tonin, E., Lagatolla, C., Prandin, L., Monti-Bragadin, C. (1995). **Identification of *Acinetobacter* isolates in the *A. calcoaceticus-A. baumannii* complex by restriction analysis of the 16S-23S rRNA intergenic-spacer sequences.** *Journal of Clinical Microbiology*, 33(5), 1108–1113.

Dortet, L., Poirel, L., Nordmann, P. (2014). **Worldwide Dissemination of the NDM-Type Carbapenemases in Gram-Negative Bacteria.** *BioMed Research International*, 2014: 12.

Eckhardt, T. (1978). **A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acids in bacteria.** *Plasmid*. 1: 584- 588.

Frost, L., Leplae, R., Summers, A. & Toussaint, A. (2005). **Mobile genetic elements: The agents of open source evolution.** *Nature Publishing Group*. 3:722-731.

Fu, Y., Liu, L., Li, X., Chen, Y., Jiang, Y., Wang, Y., Yu, Y., Xie, X. (2015). **Spread of a common blaNDM-1-carrying plasmid among diverse *Acinetobacter* species.** *Infection, Genetics and Evolution*, 32(Supplement C): 30-33.

Gaddy, J., A., Tomaras, A., P., Actis, L., A. (2009). **The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA Protein Plays a Role in Biofilm Formation on Abiotic Surfaces and in the**

Interaction of This Pathogen with Eukaryotic Cells. *Infection and Immunity*, 77(8), 3150–3160.

Garcillán-Barcia, M., Francia M. & de la Cruz, F. (2009). **The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification.** *FEMS Microbiology Reviews* 33:657–687.

Garner, J., S., Jarvis, W., R., Emori, T., G., Horan, T., C. & Hughes, J., M. (1988). **CDC definitions for nosocomial infections, 1988.** *American Journal of Infection Control* 16(3): 128-140.

Garriss, G., Waldor, M., K., Burrus, V. (2009). **Mobile antibiotic resistance encoding elements promote their own diversity.** *PLOS Genetics*, 5(12).

Garza-Ramos, U., Silva-Sánchez, J., Martínez-Romero, E. (2009). **Genética y genómica enfocadas en el estudio de la resistencia bacteriana.** *Salud pública de México* 51: s439-s446.

Gerner-Smidt, P. (1992). **Ribotyping of the Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii complex.** *Journal of Clinical Microbiology*, 30(10), 2680–2685.

Gillings, M., R. (2014). **Integrans: past, present, and future.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78(2): 257-277.

Golanbar, G., D., Lam, C., K., Chu, Y., M., Cueva, C., Tan, S., W., Silva, I., Xu, H., H. (2011). **Phenotypic and Molecular Characterization of Acinetobacter Clinical Isolates Obtained from Inmates of California Correctional Facilities.** *Journal of Clinical Microbiology*, 49(6), 2121–2131.

Gonzalez-Villoria, A., M. & Valverde-Garduno, V. (2016). **Antibiotic-Resistant Acinetobacter baumannii Increasing Success Remains a Challenge as a Nosocomial Pathogen.** *Journal of Pathogens*, 7318075.

Goodwin, S., McPherson, J., D., McCombie, W., R. (2016). **Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies.** *Nature Reviews Genetics*, 17: 333.

Goris, J., Konstantinidis, K., T., Klappenbach, J., A., Coenye, T., Vandamme, P., Tiedje, J., M. (2007). **DNA–DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities.** *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(1): 81-91.

Hall, R., M., Collis, C., M. (2006). **Mobile gene cassettes and integrans: capture and spread of genes by site specific recombination.** *Molecular Microbiology*, 15(4):593-600.

Howard, A., O’Donoghue, M., Feeney, A., Sleator, R., D. (2012). **Acinetobacter baumannii: an emerging opportunistic pathogen.** *Virulence*, 3(3), 243-250.

Huys, G., Cnockaert, M., Nemec, A., Swings, J. (2005). **Sequence-Based Typing of *adeB* as a Potential Tool To Identify Intraspecific Groups among Clinical Strains of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii***. *Journal of Clinical Microbiology*, 43 (10), 5327–5331.

Juhas, M., van der Meer, J., R., Gaillard, M., Harding, R., M., Hood, D., W., Crook, D., W. (2009). **Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution**. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(2):376-393.

Juni, E. (1984). **Genus III. *Acinetobacter* Brisou et Prévot 1954**. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, pp. 303-307. N. R. Krieg and J. G. Holt (Eds). Williams & Wilkins, Baltimore.

Jung, J. & Park, W. (2015). ***Acinetobacter* species as model microorganisms in environmental microbiology: current state and perspectives**. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(6): 2533-2548.

Klimentova, J. & Stulik, J. (2015). **Methods of isolation and purification of outer membrane vesicles from gram-negative bacteria**. *Microbiological Research*, 170: 1-9.

La Scola, B., Gundi, V., A., Khamis, A., Raoult, D. (2006). **Sequencing of the *rpoB* Gene and Flanking Spacers for Molecular Identification of *Acinetobacter* Species**. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(3), 827–832.

Lee, K., Yong, D., Jeong, S., Chong, Y. (2011). **Multidrug-resistant *Acinetobacter* spp.: increasingly problematic nosocomial pathogens**. *Yonsei medical journal* 52(6): 879-891.

Leski, T., A., Bangura, U., Jimmy, D., H., Ansumana, R., Lizewski, S., E., Li, R., W., Taitt, C., R., Vora, G., J. (2013). **Identification of *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{DIM-1}, and *bla*_{VIM} Carbapenemase Genes in Hospital Enterobacteriaceae Isolates from Sierra Leone**. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(7), 2435–2438.

Li, P., Yang, C., Xie, J., Liu, N., Wang, H., Zhang, L., Wang, Xu, Wang, Y., Qiu, S., Song, H. (2015). ***Acinetobacter calcoaceticus* from a fatal case of pneumonia harboring *bla*_{NDM-1} on a widely distributed plasmid**. *BMC Infectious Diseases*, 15: 131.

Lob, S., H., Hoban, D., J., Sahm, D., F., Badal, R., E. (2016). **Regional differences and trends in antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter baumannii***. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 47(4): 371-323.

Louwen, R., Staals, R., H., J., Endtz, H., P., van Baarlen, P., van der Oost, J. (2014). **The Role of CRISPR-Cas Systems in Virulence of Pathogenic Bacteria**. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 78(1), 74–88.

Magiorakos, A., P., Srinivasan, A., Carey, R., B., Carmeli, Y., Falagas, M., E., Giske, C., G., Harbarth, S., Hindler, J., F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D., L., Rice, L., B., Stelling, J., Struelens, M., J., Vatopoulos, A., Weber, J., T., Monnet, D., L. (2012). **Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance.** *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3): 268-281.

Mahillon, J., Léonard, C., Chandler, M. (1999). **IS elements as constituents of bacterial genomes.** *Research in Microbiology*, 150:675-687.

Martí, S., Rodríguez-Baño, J., Catel-Ferreira, M., Jouenne, T., Vila, J., Seifert, H., Dé, E. (2011). **Biofilm formation at the solid-liquid and air-liquid interfaces by *Acinetobacter* species.** *BMC Research Notes*, 4(1): 5.

Medini, D., Donati, C., Tettelin, H., Massignani, V., Rappuoli, R. (2005). **The microbial pan-genome.** *Current Opinion in Genetics & Development*, 15(6): 589-594.

Miljkovic-Selimovic, B., Babic, T., Kocic, B., Stojanovic, P., Ristic, L., Dinic, M. (2007). **Bacterial Plasmids.** *Acta Medica Medianae*, 46:61-65.

Mussi, M., A., Gaddy, J., A., Cabruja, M., Arivett, B., A., Viale, A., M., Rasia, R., Actis, L., A. (2010). **The Opportunistic Human Pathogen *Acinetobacter baumannii* Senses and Responds to Light.** *Journal of Bacteriology*, 192(24), 6336–6345.

Nayoung, K. (2012). **Investigation into plasmid replication and partitioning systems in proteobacteria.** (PhD). Department of Biology University of York, United Kingdom.

Nemec, A., Krizova, L., Maixnerova, M., Diancourt, L., van der Reijden, T., J., Brisse, S., van den Broek, P., Dijkshoorn, L. (2008). **Emergence of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* in the Czech Republic is associated with the spread of multidrug-resistant strains of European clone II.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62: 484–489.

Nemec, A., Krizova, L., Maixnerova, M., Sedo, O., Brisse, S., Higgins, P., G. (2015). ***Acinetobacter seifertii* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex isolated from human clinical specimens.** *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65: 934-942.

Ochman, H., Lawrence, J., G., Groisman, E., A. (2000). **Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation.** *Nature*, 405: 299-304.

Olivares, J., Bernardini, A., Garcia-Leon, G., Corona, F., Sanchez M., Martinez, J., L. (2013). **The intrinsic resistome of bacterial pathogens.** *Frontiers in Microbiology*, 4: 103.

Pendleton, J., N., Gorman, S., P., Gilmore, B., F. (2013). **Clinical relevance of the ESKAPE pathogens.** *Expert Review of Anti-infective Therapy* 11(3): 297-308.

Peleg, A., Y., Seifert, H., Paterson, D., L. (2008). **Acinetobacter baumannii: emergence of a successful pathogen.** *Clinical microbiology reviews*, 21(3), 538-582.

Salyers, A., A., Shoemaker, N., B., Stevens, A., M., Li, L., Y. (1995). **Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements.** *Microbiological Reviews*, 59(4):579-590.

Schroeder, M., Brooks, B., D. & Brooks, A., E. (2017). **The Complex Relationship between Virulence and Antibiotic Resistance.** *Genes (Base1)*, 8(1):39.

Skerman, V., B., D., McGowan, V., Sneath, P., H., A. (1980). **Approved Lists of Bacterial Names.** *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 30(1): 225-420.

Siefert J., L. (2009). **Defining the Mobilome.** In: Gogarten M.B., Gogarten J.P., Olendzenski L.C. (eds) Horizontal Gene Transfer. *Methods in Molecular Biology*, vol 532. Humana Press.

Siguier, P., Gourbeyre, E., Chandler, M. (2014). **Bacterial insertion sequences: their genomic impact and diversity.** *FEMS Microbiology Reviews*, 38(5): 865-891.

Spellberg, B., Guidos, R., Gilbert, D., Bradley, J., Boucher, H., W., Scheld, W., M., Bartlett, J. G., Edwards, J. (2008). **The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America.** *Clinical Infection Disease*, 46(2): 155-164.

Stearns, S., C. & Hoekstra, R., F. (2005). **Evolution: An introduction** (2nd ed.). Oxford, NY: Oxford University Press pp. 38-40.

Rafei, R., Kempf, M., Eveillard, M., Dabboussi, F., Hamze, M., Joly-Guillou, M., L. (2014). **Current molecular methods in epidemiological typing of Acinetobacter baumannii.** *Future Microbiology*, 9(10):1179-94.

Rhoads, A., & Au, K., F. (2015). **PacBio sequencing and its applications.** *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 13(5), 278-289.

Rice, L., B. (2008). **Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE.** *The Journal of Infection Disease* 197(8): 1079-1081.

Richter, M., & Rosselló-Móra, R. (2009). **Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(45), 19126–19131.

Rumbo, C., Fernandez-Moreira, E., Merino, M., Poza, M., Mendez, J., A., Soares, N., C., 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*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55: 3084-3090.

Tayabali, A., F., Nguyen, K., C., Shwed, P., S., Crosthwait, J., Coleman, G., Seligy, V., L. (2012). **Comparison of the virulence potential of *Acinetobacter* strains from clinical and environmental sources.** *PLoS one*, 7(5), e37024.

Tettelin, H., Massignani, V., Cieslewicz, M. J., Donati, C., Medini, D., Ward, N. L., Fraser, C., M. (2005). **Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: Implications for the microbial “pan-genome.”** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(39), 13950–13955.

Tindall, B., J., Rosselló-Móra, R., Busse, H., J., Ludwig, W., Kämpfer, P. (2010). **Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes.** *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60: 249–266.

Vandecraen, J., Chandler, M., Aertsen, A., Van Houdt, R. (2017). **The impact of insertion sequences on bacterial genome plasticity and adaptability.** *Critical Reviews in Microbiology*, 43(6): 709-730.

van Dessel, H., Dijkshoorn, L., van der Reijden, T., Bakker, N., Paauw, A., van den Broek, P., Verhoef, J., Brisse, S. (2004). **Identification of a new geographically widespread multiresistant *Acinetobacter baumannii* clone from European hospitals.** *Research in Microbiology*, 155(2): 105-112.

Vallenet, D., Nordmann, P., Barbe, V., Poirel, L., Mangenot, S., Bataille, E., Dossat, C., Gas, S., Kreimeyer, A., Lenoble, P., Oztas, S., Poulain, J., Segurens, B., Robert, C., Abergel, C., Claverie, J. M., Raoult, D., Medigue, C., Weissenbach, J., Cruveiller, S. (2008). **Comparative Analysis of *Acinetobacters*: Three Genomes for Three Lifestyles.** *PLoS ONE*, 3(3), e1805.

Vernikos, G., Medini, D., Riley, D. R., Tettelin, H. (2015). **Ten years of pan-genome analyses.** *Current Opinion in Microbiology*, 23(Supplement C): 148-154.

Wang, Y., Wu, C., Zhang, Q., Qi, J., Liu, H., Wang, Y., He, T., Ma, L., Lai, J., Shen, Z., Liu, Y., Shen, J. (2012). **Identification of New Delhi Metallo- β -lactamase 1 in *Acinetobacter lwoffii* of Food Animal Origin.** *PLoS ONE*, 7(5), e37152.

Yang, J., Chen, Y., Jia, X., Luo, Y., Song, Q., Zhao, W., Wang, Y., Liu, H., Zheng, D., Xia, Y., Yu, R., Han, X., Jiang, G., Zhou, Y., Zhou, W., Hu, X., Liang, L., Han, L. (2012). **Dissemination and characterization of NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* in an intensive care unit in China.** *Clinical Microbiology and Infection*, 18(12): E506-E513.

Zerbino, D., R., & Birney, E. (2008). **Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs.** *Genome research*, 18(5), 821-829.

Zong, Z. & Zhang, X. (2013). **blaNDM-1-carrying Acinetobacter johnsonii detected in hospital sewage**. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(5): 1007-1010.

10. ANEXOS

10.1 ANEXO I: Script utilizado para la Identificación de genes únicos hospitalarios y ambientales, sección 5.9.

```
#!/usr/bin/perl

$cepa1 = $ARGV[0];
open (CEPA1, "$cepa1") or print "can't open file gbk: $!\n";
while (<CEPA1>){
    $line=$_;
    chomp $line;
    next if $line=~/^Gene/;
    @line=split /\./, $line;
    for ($i=0; $i<@line; $i++){
        $hospital=$line[1]+$line[2]+$line[3]+$line[4];
        $ambiental=$line[5]+$line[6]+$line[7];
        $contar4_0++ if $hospital==4 and $ambiental==0;
        $contar3_0++ if $hospital==3 and $ambiental==0;
        $contar2_0++ if $hospital==2 and $ambiental==0;
        $contar0_3++ if $hospital==0 and $ambiental==3;
        $contar0_2++ if $hospital==0 and $ambiental==2;
    }
    last;
}
if ($hospital==4 and $ambiental==0){
    print "4_0 = $line[0]\n";
}
if ($hospital==3 and $ambiental==0){
    print "3_0 = $line[0]\n";
}
if ($hospital==2 and $ambiental==0){
    print "2_0 = $line[0]\n";
}
if ($hospital==0 and $ambiental==2){
    print "0_2 = $line[0]\n";
}
if ($hospital==0 and $ambiental==3){
```

```

    print "0_3 = $line[0]\n";
  }
  @line=();
  $line[1]=$line[2]=$line[3]=$line[4]=$line[5]=$line[6]=$line[7]=();
}
close CEPA1;

print "NÚMEROS\n4_0 = $contar4_0\n3_0 = $contar3_0\n2_0 = $contar2_0\n0_2 =
$contar0_2\n0_3 = $contar0_3\n";

__END__

```

10.2 ANEXO II: Genes presentes únicamente en aislados clínicos. Listado de los 66 genes que solamente se encuentran presentes en aislados clínicos y ausentes en aislados ambientales por especie.

<i>Acinetobacter junii</i>				
Gene	Annotation	COG code	COG number	Function
lspA_1	Lipoprotein signal peptidase	MU	COG0597	Lipoprotein signal peptidase
tolB	Protein TolB	U	COG0823	Periplasmic component of the Tol biopolymer transport system
group_1295	hypothetical protein	G	COG2220	L-ascorbate metabolism protein UlaG, beta-lactamase superfamily
sdpR_2	Transcriptional repressor SdpR	K	COG0640	DNA-binding transcriptional regulator, ArsR family
rbn_2	Ribonuclease BN	J	COG1234	Ribonuclease BN, tRNA processing enzyme
blh_2	Beta-lactamase hydrolase-like protein	R	COG3453	Predicted phosphohydrolase, protein tyrosine phosphatase (PTP) superfamily, DUF442 family
fabG_3	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase FabG	IQR	COG1028	NAD(P)-dependent dehydrogenase, short-chain alcohol dehydrogenase family
group_2086	hypothetical protein	G	COG0662	Mannose-6-phosphate isomerase, cupin superfamily
hsaD	4,5:9,10-diseco-3-hydroxy-5,9,17-trioxoandrosta-1(10),2-diene-4-oate hydrolase	I	COG2267	Lysophospholipase, alpha-beta hydrolase superfamily
nadX_1	L-aspartate dehydrogenase	R	COG1712	Predicted dinucleotide-utilizing enzyme
group_3847	hypothetical protein	S	COG3832	Uncharacterized conserved protein YndB, AHSA1/START domain
group_891	hypothetical protein	S	COG3762	Uncharacterized membrane protein

<i>Acinetobacter soli</i>				
Gene	Annotation	COG code	COG number	Function
intA_1	Prophage CP4-57 integrase	LX	COG0582	Integrase
group_1269	hypothetical protein	X	COG2801	Transposase InsO and inactivated derivatives
group_1020	hypothetical protein	D	COG1196	Ankyrin repeat protein/ ANK Superfamily/ Chromosome segregation ATPase
yfcG_1	Disulfide-bond oxidoreductase YfcG	O	COG0625	Glutathione S-transferase
czcC_2	Cobalt-zinc-cadmium resistance protein CzcC precursor	M	COG1538	Outer membrane protein TolC
xylB_2	Aryl-alcohol dehydrogenase	R	COG1062	Zn-dependent alcohol dehydrogenase
ydcR_2	putative HTH-type transcriptional regulator YdcR	KE	COG1167	DNA-binding transcriptional regulator, MocR family, contains an aminotransferase domain
<i>Acinetobacter radioresistens</i>				
Gene	Annotation	COG code	COG number	Function
intA_1	Prophage CP4-57 integrase	LX	COG0582	Integrase
alsT	Amino-acid carrier protein AlsT	E	COG1115	Na+/alanine symporter
<i>Acinetobacter johnsonii</i>				
Gene	Annotation	COG code	COG number	Function
group_1303	hypothetical protein	C	COG1359	Antibiotic biosynthesis monooxygenase
fruA	PTS system fructose-specific EIIBC component	G	COG1445	Phosphotransferase system fructose-specific component IIB
group_2132	hypothetical protein	S	COG4715	Heavy metal resistance protein CzcA
group_2133	hypothetical protein	K	COG1396	Transcriptional regulator, contains XRE-family HTH domain
group_3326	hypothetical protein	I	COG2067	Long-chain fatty acid transport protein
ptsl_2	Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase	G	COG4668	Mannitol/fructose-specific phosphotransferase system, IIA domain
group_3608	hypothetical protein	T	COG3550	Serine/threonine protein kinase HipA, toxin component of the HipAB toxin-antitoxin module
adaA	Bifunctional transcriptional activator/DNA repair enzyme AdaA	K	COG4977	Transcriptional regulator GlxA family, contains an amidase domain and an AraC-type DNA-binding HTH domain
group_35	Transposase	X	COG4372	DDE Tnp IS66 C, Transposase IS66 family
group_1307	hypothetical protein	K	COG2315	Predicted DNA-binding protein with double-wing structural motif, MmcQ/YjbR family
lacC	Tagatose-6-phosphate kinase	G	COG1105	Fructose-1-phosphate kinase or kinase (PfkB)
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>				
Gene	Annotation	COG code	COG number	Function
group_3086	hypothetical protein	X	COG4733	Phage-related protein, tail component
elbB	Enhancing lycopene biosynthesis protein 2	Q	COG3155	Enhancing lycopene biosynthesis protein 2
epsO	Putative pyruvyl transferase EpsO	GM	COG5039	Exopolysaccharide biosynthesis protein EpsI, predicted pyruvyl transferase
cinA	Putative competence-damage inducible protein	H	COG1546	Nicotinamide mononucleotide (NMN) deamidase PncC
group_6383	hypothetical protein	I	COG2067	Transporter OmpP1/FadL/TodX family. Long-chain fatty acid transport protein
mopA	Molybdenum-pterin-binding protein MopA	K	COG2005	DNA-binding transcriptional regulator ModE (molybdenum-dependent)
group_3083	hypothetical protein	S	COG2369	Uncharacterized conserved protein, contains phage Mu gpF-like domain

10.3 ANEXO III: Genes presentes únicamente en aislados clínicos sin asignación COG.

Listado de 27 genes a los que no se les asignó una función general (COG). Se realizó un BLASTx (nr) y se identificaron los dominios conservados de las proteínas. Estos genes solamente se encuentran presentes en aislados clínicos y no en aislados ambientales.

Acinetobacter junii			BLAST nr		
Gene	Annotation	COG code	% Cobertura	% Identidad	Dominio conservado / Description
group_1836	hypothetical protein	No COG in database	-	-	Protein of unknown function (DUF3867 super family)
group_122	hypothetical protein	No COG in database	-	-	-
group_2085	hypothetical protein	No COG in database	-	-	-
Acinetobacter soli			BLAST nr		
Gene	Annotation	COG code	% Cobertura	% Identidad	Dominio conservado / Description
group_526	hypothetical protein	No COG in database	-	-	No tiene dominios conservados
cas3	CRISPR-associated nuclease/helicase Cas3 subtype I-F/YPEST	COG1203 (V)	99	96	Cas3_Cas2_I-F / Type I-F CRISPR -associated helicase Cas3
Acinetobacter radioresistens			BLAST nr		
Gene	Annotation	COG code	% Cobertura	% Identidad	Dominio conservado / Description
group_382	hypothetical protein	S	99	99	Phage tail S / Phage morphogenesis protein
		X	98	59	Mu-like prophage protein gpG / Mobilome: prophages, transposons
group_881	hypothetical protein	No COG in database	85	24	Gp37 super family / Gp37 protein is expressed in bacteria but is of viral origin as it is found in phage BcepMu and is probably a pathogenesis factor
		COG0500 (Q)	60	23	Methyltransf_23 / Methyltransferase domain
			60	23	SmtA / S-adenosyl-L-methionine (SAM)-dependent methyltransferase
group_890	hypothetical protein	COG3311 (KX)	98	99	AlpA / Predicted DNA-binding transcriptional regulator AlpA (Transcription, mobilome: prophages, transposons)
			97	97	Phage AlpA / MerR family transcription regulators mediate responses to stress including exposure to heavy metals, drugs or oxygen radicals in eubacterial and some archaeal species
Acinetobacter johnsonii			BLAST nr		
Gene	Annotation	COG code	% Cobertura	% Identidad	Dominio conservado / Description
group_1362	hypothetical protein	No COG in database	93	38	HTH_XRE / XRE (Xenobiotic Response Element) family transcriptional regulator controls the expression of genes involved in stress response
		No COG in database	83	46	Toxin-antitoxin system, antitoxin component, Xre family
group_2051	hypothetical protein	No COG in database	-	-	-
group_2060	hypothetical protein	No COG in database	-	-	-
group_6962	hypothetical protein	No COG in database	-	-	-
Acinetobacter calcoaceticus			BLAST nr		
Gene	Annotation	COG code	% Cobertura	% Identidad	Dominio conservado / Description
group_3076	hypothetical protein	No COG in database	97	85	MATE_like super family/ Multidrug and toxic compound extrusion family and similar proteins. MATE family are involved in exporting metabolites across the cell membrane and are responsible for multidrug resistance (MDR) in many bacteria and animals.
			86	36	
group_3078	hypothetical protein	S	91	59	DUF2070 / Predicted membrane protein, highly conserved region of unknown function.
		COG1696 (M)	25	26	DltB / D-alanyl-lipoteichoic acid acyltransferase DltB, MBOAT superfamily (Cell wall/membrane/envelope biogenesis)
ybiP	Putative phosphoethanolamine transferase YbiP	No COG in database	99	100	LptA / Lipooligosaccharide Phosphoethanolamine Transferase A (LptA) or Lipid A Phosphoethanolamine Transferase catalyzes the modification of the lipid A headgroups by phosphoethanolamine (PEA) or 4-amino-arabinose residues. Lipopolysaccharides, also called endotoxins, protect bacterial pathogens from antimicrobial peptides and have roles in virulence. The PEA modified lipid A increases resistance to the cationic cyclic polypeptide antibiotic, polymyxin
group_3081	hypothetical protein	No COG in database	97	83	- /Protein FilE (Acinetobacter baumannii - complejo ACB)
group_3084	hypothetical protein	No COG in database	64	34	- / CARB family carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase
group_3085	hypothetical protein	No COG in database	77	73	- / Bacteriophage T4 gp9/10-like protein (phage tail protein/ tail fiber)

group_6395	hypothetical protein	No COG in database	99	94	- / Sec1 family, general secretion
		No COG in database	99	87	GidA / A tRNA Modification Enzyme that contributes to the growth and Virulence of Streptococcus
group_6402	hypothetical protein	No COG in database	48	26	Epoxide hydrolase N terminus (EHN) / Epoxide hydrolase (detoxification capacity for epoxides)
group_6417	hypothetical protein	No COG in database	-	-	-
group_6419	hypothetical protein	(N)	98	100	- / Pilus subunit FliA domain protein
group_6430	hypothetical protein	No COG in database	-	-	-
group_6507	hypothetical protein	No COG in database	99	89	IcIR super Family / Members of the IcIR family have been reported to regulate a wide variety of processes: carbon metabolism in the enterobacteriaceae, degradation of aromatic compounds in soil bacteria, inactivation of quorum-sensing signals in Agrobacterium, and plant virulence in certain members of the enterobacteriaceae.
group_6511	hypothetical protein	No COG in database	73	31	PRK00222 / methionine sulfoxide reductase B
group_6516	hypothetical protein	No COG in database	99	36	SecA_DEAD / Preprotein translocase subunit SecA binds to the plasma membrane where it interacts with proOmpA to support translocation of proOmpA through the membrane
group_6581	hypothetical protein	No COG in database	99	93	DUF4882 super family / Consists of several uncharacterized proteins mainly found in various Acinetobacter species

10.4 ANEXO IV: Genes presentes únicamente en aislados ambientales. Listado de los 45 genes que solamente se encuentran presentes en aislados ambientales y ausentes en aislados clínicos por especie. Aquellos genes que están asociados con factores de virulencia están señalados en recuadros de color verde.

Acinetobacter junii					
Gene	Annotation	COG code	COG number	Function	
ybhF_1	putative ABC transporter ATP-binding protein YbhF	V	COG1131	ABC-type multidrug transport system, ATPase component	
yoeB	Toxin YoeB	V	COG4115	Toxin component of the Txe-Axe toxin-antitoxin module, Txe/YoeB family	
mdtN_2	Multidrug resistance protein MdtN	MVU	COG0845	Multidrug efflux pump subunit AcrA (membrane-fusion protein)	
apxB	Toxin RTX-I translocation ATP-binding protein	V	COG2274	ABC-type bacteriocin/antibiotic exporters, contain an N-terminal double-glycine peptidase domain	
ppk_2	Polyphosphate kinase	P	COG0855	Polyphosphate kinase	
group_1990	hypothetical protein	C	COG2326	Polyphosphate kinase 2, PPK2 family	
grxC_2	Glutaredoxin-3	O	COG0695	Glutaredoxin	
oprM_1	Outer membrane protein OprM precursor	MV	COG1538	Outer membrane protein TolC	
kgfP_1	Alpha-ketoglutarate permease	GEPRU	COG0477	MFS family permease	
msrA3	Peptide methionine sulfoxide reductase MsrA 3	O	COG0225	Peptide methionine sulfoxide reductase MsrA	
msrB_1	Peptide methionine sulfoxide reductase MsrB	O	COG0229	Peptide methionine sulfoxide reductase MsrB	
group_3566	hypothetical protein	H	COG2329	Heme-degrading monooxygenase HmoA and related ABM domain proteins	
cirA_3	Colicin I receptor precursor	P	COG4771	Outer membrane receptor for ferrienterochelin and colicins	
tamA	Translocation and assembly module TamA precursor	M	COG0729	Outer membrane translocation and assembly module TamA	
cph2_2	hypothetical protein	TK	COG3706	Two-component response regulator, PleD family, consists of two REC domains and a diguanylate cyclase (GGDEF) domain	
yhhJ	Inner membrane transport permease YhhJ	SX	COG1511	Uncharacterized membrane protein YhgE, phage infection protein (PIP) family	
group_3196	hypothetical protein	S	COG3472	Uncharacterized protein	
group_3223	hypothetical protein	S	COG3174	Uncharacterized membrane protein, DUF4010 family	

<i>Acinetobacter soli</i>				
Gene	Annotation	COG code	COG number	Function
group_133	hypothetical protein	U	COG3210	Large exoprotein involved in heme utilization or adhesion
tnsB	Transposon Tn7 transposition protein TnsB	X	COG2801	Transposase InsO and inactivated derivatives
group_1778	hypothetical protein	X	COG2842	Bacteriophage DNA transposition protein, AAA+ family ATPase
comM_2	Competence protein ComM	O	COG0606	Predicted ATPase with chaperone activity
btuB_1	Vitamin B12 transporter BtuB precursor	H	COG4206	Outer membrane cobalamin receptor protein
group_2008	hypothetical protein	D	COG1196	Chromosome segregation ATPase
cusB	Cation efflux system protein CusB precursor	PU	COG5569	Periplasmic Cu and Ag efflux protein CusF
cusF	Cation efflux system protein CusF precursor	PU	COG5569	Periplasmic Cu and Ag efflux protein CusF
group_143	hypothetical protein	S	COG5449	Uncharacterized protein
group_1931	hypothetical protein	S	COG4834	Uncharacterized protein
group_1932	hypothetical protein	S	COG3566	Uncharacterized protein
group_955	hypothetical protein	S	COG3567	Uncharacterized protein

<i>Acinetobacter radioresistens</i>				
Gene	Annotation	COG code	COG number	Function
group_1484	hypothetical protein	KX	COG3311	Predicted DNA-binding transcriptional regulator AlpA
paiB	Protease synthase and sporulation protein PAI 2	T	COG2808	Predicted FMN-binding regulatory protein PaiB
cdhR	HTH type transcriptional regulator CdhR	K	COG4977	Transcriptional regulator GbxA family, contains an amidase domain and an AraC-type DNA-binding HTH domain
sttH	Streptothricin hydrolase	HR	COG1335	Nicotinamidase-related amidase
group_985	hypothetical protein	G	COG2220	L-ascorbate metabolism protein UlaG, beta-lactamase superfamily

<i>Acinetobacter johnsonii</i>				
Gene	Annotation	COG code	COG number	Function
tpiA	Triosephosphate isomerase	G	COG0149	Triosephosphate isomerase
group_1593	hypothetical protein	T	COG3550	Serine/threonine protein kinase HipA, toxin component of the HipAB toxin-antitoxin module
group_1725	hypothetical protein	M	COG3637	Opacity protein and related surface antigens
group_1924	hypothetical protein	P	COG5455	Periplasmic regulator RcnB of Ni and Co efflux
group_2544	hypothetical protein	K	COG1396	Transcriptional regulator, contains XRE-family HTH domain
group_1589	hypothetical protein	S	COG4628	Uncharacterized conserved protein, DUF2132 family
group_2484	hypothetical protein	S	COG4719	Uncharacterized protein

<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>				
Gene	Annotation	COG code	COG number	Function
calB_2	Coniferyl aldehyde dehydrogenase	C	COG1012	Acyl-CoA reductase or other NAD-dependent aldehyde dehydrogenase
sbmA	Peptide antibiotic transporter SbmA	I	COG1133	ABC-type long-chain fatty acid transport system, fused permease and ATPase components
aac	hypothetical protein	R	COG4552	Predicted acetyltransferase

10.5 ANEXO V: Genes presentes únicamente en aislados ambientales sin asignación COG.
Listado de 43 genes a los que no se les asignó una función general (COG). Estos genes solamente se encuentran presentes en aislados ambientales y no en aislados clínicos.

<i>Acinetobacter junii</i>				
Gene	Annotation	COG code	COG number	Function
group_1106	hypothetical protein	No COG in database	-	-
group_1899	hypothetical protein	No COG in database	-	-
group_1986	hypothetical protein	No COG in database	-	-
betl_2	HTH-type transcriptional regulator Bet	No COG in database	-	-
group_2974	hypothetical protein	No COG in database	-	-
group_2975	hypothetical protein	No COG in database	-	-
cfa_1	Cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	No COG in database	-	-
group_2838	hypothetical protein	No COG in database	-	-

Acinetobacter soli

Gene	Annotation	COG code	COG number	Function
group_154	hypothetical protein	No COG in database	-	-
group_16	hypothetical protein	No COG in database	-	-
group_1847	hypothetical protein	No COG in database	-	-
tusA_1	Sulfurtransferase TusA	No COG in database	-	-
group_2009	hypothetical protein	No COG in database	-	-
group_929	hypothetical protein	No COG in database	-	-
group_930	hypothetical protein	No COG in database	-	-
group_931	hypothetical protein	No COG in database	-	-
group_934	hypothetical protein	No COG in database	-	-
group_938	hypothetical protein	No COG in database	-	-
group_940	hypothetical protein	No COG in database	-	-
group_951	hypothetical protein	No COG in database	-	-
group_953	hypothetical protein	No COG in database	-	-
group_960	hypothetical protein	No COG in database	-	-
group_961	hypothetical protein	No COG in database	-	-

Acinetobacter radioresistens

Gene	Annotation	COG code	COG number	Function
group_1021	hypothetical protein	No COG in database	-	-
yarA	Adhesin YacA precursor	No COG in database	-	-
group_1538	hypothetical protein	No COG in database	-	-
group_1686	hypothetical protein	No COG in database	-	-
group_1687	hypothetical protein	No COG in database	-	-
group_1807	hypothetical protein	No COG in database	-	-

Acinetobacter johnsonii

Gene	Annotation	COG code	COG number	Function
group_1500	hypothetical protein	No COG in database	-	-
group_1525	hypothetical protein	No COG in database	-	-
group_1563	hypothetical protein	No COG in database	-	-
group_1579	hypothetical protein	No COG in database	-	-
group_1585	hypothetical protein	No COG in database	-	-
group_1656	hypothetical protein	No COG in database	-	-
group_1817	hypothetical protein	No COG in database	-	-
group_1882	hypothetical protein	No COG in database	-	-
group_1944	hypothetical protein	No COG in database	-	-
group_1945	hypothetical protein	No COG in database	-	-
group_1946	hypothetical protein	No COG in database	-	-
group_2482	hypothetical protein	No COG in database	-	-
group_3086	hypothetical protein	No COG in database	-	-
group_6986	23S ribosomal RNA	No COG in database	-	-

10.6 ANEXO VI: Base de datos de los 92 genes asociados a factores de virulencia identificados en *Acinetobacter baumannii* utilizados en este estudio, sección 6.8.

Gene	Protein ID	Description	Reference
<i>feo B</i>	WP_001278225.1	Ferrous iron transporter B	doi: 10.1128/mSphere.00013-15
<i>pntB</i>	WP_011858352.1	NAD(P) transhydrogenase subunit beta	doi: 10.1128/mSphere.00013-15
<i>feoB</i>	ABO11102.1	Putative ferrous iron transport protein B	doi: 10.1128/mSphere.00013-15
<i>fepA</i>	ABO11412.1	Ferric enterobactin receptor precursor	doi: 10.1128/mSphere.00013-15
<i>ddc</i>	ABO12853.2	D-ala-D-ala-carboxypeptidase	doi: 10.1128/mSphere.00013-15
<i>purL</i>	ABO13002.2	Phosphoribosylformylglycinamide synthase	doi: 10.1128/mSphere.00013-15
<i>guaA</i>	ABO10615.2	GMP synthetase	doi: 10.1128/mSphere.00013-15
<i>A1S_0419</i>	ABO10874.1	Hypothetical protein A1S_0419	doi: 10.1128/mSphere.00013-15
<i>RodA</i>	ABO12737.2	EsvE3	DOI: 10.1101/gad.1510307
<i>uppP</i>	ABO13180.2	Bacitracin resistance protein	DOI: 10.1101/gad.1510307
<i>ilvD</i>	ABO13844.2	Dihydroxy-acid dehydratase	DOI: 10.1128/JB.00834-08
<i>AB57_3081</i>	ACJ42413.1	Biofilm-associated protein	DOI: 10.1128/JB.00834-08
<i>Omp38</i>	ABO13246.2	Outer membrane protein A	doi: 10.1128/IAI.00096-09.
<i>A1S_0884</i>	ABO11316.1	Putative outer membrane protein	DOI: 10.1101/gad.1510307
<i>A1S_1033</i>	ABO11465.2	Putative antigen	DOI: 10.1101/gad.1510307
<i>ABK1_2999</i>	ADX04633.1	Biofilm associated protein	DOI: 10.1128/JB.06109-11
<i>A1S_1032</i>	ABO11464.2	Hypothetical protein	DOI: 10.1101/gad.1510307
<i>A1S_2696</i>	ABO13109.2	Hypothetical protein	DOI: 10.1101/gad.1510307
<i>OmpA/MotB</i>	ABO11623.2	OmpA-like	DOI: 10.1101/gad.1510307
<i>MFS Transporter</i>	ABO10595.2	(MFS) metabolite/H ⁺ symporter	DOI: 10.1101/gad.1510307
<i>A1S_0269</i>	ABO10744.1	Putative general secretion pathway protein	DOI: 10.1101/gad.1510307
<i>BfmR</i>	AAX40744.1	Response regulator, two-component system	DOI: 10.1128/mSphere.00082-16
<i>BfmS</i>	AAX40745.1	Response regulator, two-component system	http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0070329
<i>CsuA</i>	AAP43036.1	Usher-chaperone system	doi: 10.3389/fmicb.2012.00148
<i>CsuB</i>	AAP43037.1	Usher-chaperone system	doi: 10.3389/fmicb.2012.00148
<i>CsuC</i>	AAP43038.1	Usher-chaperone system	doi: 10.3389/fmicb.2012.00148
<i>CsuD</i>	WP_044557399.1	Usher-chaperone system	doi: 10.3389/fmicb.2012.00148
<i>CsuE</i>	AAP43040.1	Usher-chaperone system	doi: 10.3389/fmicb.2012.00148
<i>PgaA</i>	ACV90433.1	PNAG synthesis	doi:10.1128/JB.00647-09

<i>PgaB</i>	ACV90434.1	PNAG synthesis	doi:10.1128/JB.00647-09
<i>PgaC</i>	ACV90435.1	PNAG synthesis	doi:10.1128/JB.00647-09
<i>PgaD</i>	ACV90436.1	PNAG synthesis	doi:10.1128/JB.00647-09
<i>ptk</i>	WP_001075368.1	Tyrosine protein kinase	http://dx.doi.org/10.1128/AAC.44.1.196-199.2000 .
<i>entA</i>	WP_001257961.1	Siderophore biosynthesis	http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00096-09 .
<i>epsA</i>	WP_000872534.1	Serine recombinase	http://dx.doi.org/10.1128/AAC.44.1.196-199.2000 .
<i>nfuA</i>	ABO11411.2	Iron transport protein	http://dx.doi.org/10.1128/JB.00647-09 .
<i>Phospholipase D</i>	ABO13297.2	Putative phospholipase D endonuclease domain	http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.2008/019471-0 .
<i>Phospholipase D</i>	ABO13392.1	Putative phospholipase D protein	doi:10.1128/IAI.00889-09.
<i>ATA_ACIBT</i>	A3M3H0	Adhesin Ata autotransporter	doi:10.1128/IAI.06096-11.
<i>EpsA</i>	L9P1Q5	Putative polysaccharide export outer membrane protein	doi:10.1128/IAI.00366-10.
<i>CpaA</i>	A0A023T6V0	Deregulates human blood coagulation	doi: 10.1111/1574-6968.12496.
<i>znuA</i>	ABO10629.2	High affinity Zn transport protein	https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003068
<i>znuB</i>	ABO10626.2	High affinity Zn transport protein	https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003068
<i>znuC</i>	ABO10627.2	High affinity Zn transport protein	https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003068
<i>zur</i>	ABO10628.2	Transcriptional repressor of Zn transport system	https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003068
<i>znuD1</i>	ABO13298.2	Putative TonB-dependent receptor protein	https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003068
<i>znuD2</i>	ABO13864.1	Hypothetical protein A1S_3475	https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003068
<i>bauA</i>	A0A0D5YG89	Ferric acinetobactin receptor	DOI: 10.1099/mic.0.27141-0
<i>BauA</i>	AAT52186.1	Ferric acinetobactin receptor	DOI: 10.1099/mic.0.27141-0
<i>barA</i>	BAC87909.1	ABC transporter	DOI 10.1099/mic.0.27141-0
<i>barB</i>	BAC87910.1	ABC transporter	DOI 10.1099/mic.0.27141-0
<i>BauB</i>	AAT52185.1	Ferric acinetobactin binding protein	DOI 10.1099/mic.0.27141-0
<i>BauC</i>	AAT52183.1	Iron ABC transporter permease	DOI 10.1099/mic.0.27141-0
<i>BauD</i>	AAT52182.1	Iron ABC transporter permease	DOI 10.1099/mic.0.27141-0
<i>BauE</i>	AAT52184.1	Ferric siderophore ABC transporter	DOI 10.1099/mic.0.27141-0
<i>BasC</i>	AAT52187.1	Putative histamine N-monooxygenase	DOI 10.1007/s10534-008-9202-3
<i>BasD</i>	AAT52188.1	Biosynthesis of acinetobactin	DOI 10.1007/s10534-008-9202-3
<i>A1S_0803</i>	ABO11241.2	Trehalose-6-phosphate synthase	DOI:10.1111/j.1574-695X.2011.00926.x
<i>A1S_0804</i>	ABO11242.2	Trehalose-6-phosphate phosphatase	DOI:10.1111/j.1574-695X.2011.00926.x
<i>CsuA/B</i>	ABO12645.2	Pilus mediated attachment to abiotic surfaces	DOI:10.1111/j.1574-695X.2011.00926.x
<i>A1S_1509</i>	ABO11936.2	Pili assembly chaperone	DOI:10.1111/j.1574-695X.2011.00926.x
<i>A1S-1949</i>	ABO12376.2	Putative diguanylate cyclase/phosphodiesterase	DOI:10.1111/j.1574-695X.2011.00926.x
<i>GalE</i>	ABO12414.2	Putative UDP-galactose 4-epimerase	DOI: 10.1101/gad.1510307.

<i>A1S_0390</i>	ABO10849.1	Putative type III effector	DOI:10.1111/j.1574-695X.2011.00926.x
<i>A1S_1634</i>	ABO12061.2	IscRSUA operon repressor	DOI:10.1111/j.1574-695X.2011.00926.x
<i>A1S_1608</i>	ABO12035.2	Heme-binding protein A precursor	DOI:10.1111/j.1574-695X.2011.00926.x
<i>A1S_1609</i>	ABO12036.2	Heme-binding protein A precursor	DOI:10.1111/j.1574-695X.2011.00926.x
<i>A1S_1787</i>	ABO12214.2	Putative iron transport protein	DOI:10.1111/j.1574-695X.2011.00926.x
<i>A1S_0037</i>	ABO10532.2	Alkali-inducible disulfide interchange protein	DOI:10.1111/j.1574-695X.2011.00926.x
<i>PldA</i>	ABO12346.2	Putative phospholipase A1 precursor	doi:10.1128/IAI.00889-09
<i>A1S_0582</i>	ABO11033.2	Putative DNA uptake protein	DOI:10.1111/j.1574-695X.2011.00926.x
<i>A1S_0321</i>	ABO10785.2	Recombination and DNA repair protein	DOI:10.1111/j.1574-695X.2011.00926.x
<i>A1S_1637</i>	ABO12064.1	DNA-binding protein HU-beta	DOI:10.1111/j.1574-695X.2011.00926.x
<i>A1S_1962</i>	ABO12389.2	DNA strand exchange and recombination protein	DOI:10.1111/j.1574-695X.2011.00926.x
<i>A1S_0241</i>	ABO10716.2	Site-specific tyrosine recombinase	DOI:10.1111/j.1574-695X.2011.00926.x
<i>A1S_1573</i>	ABO12000.2	Integration host factor beta subunit	DOI:10.1111/j.1574-695X.2011.00926.x
<i>AdeB</i>	ABO12177.2	Multi-drug efflux protein	DOI:10.1111/j.1574-695X.2011.00926.x
<i>A1S_2306</i>	ABO12729.2	Putative RND family drug transporter	DOI:10.1111/j.1574-695X.2011.00926.x
<i>A1S_1649</i>	ABO12076.2	Putative RND family drug transporter	DOI:10.1111/j.1574-695X.2011.00926.x
<i>A1S_2375</i>	ABO12794.2	Putative ABC transporter	DOI:10.1111/j.1574-695X.2011.00926.x
<i>A1S_2376</i>	ABO12795.1	Putative ABC transporter	DOI:10.1111/j.1574-695X.2011.00926.x
<i>A1S_2377</i>	ABO12796.1	Putative ABC transporter	DOI:10.1111/j.1574-695X.2011.00926.x
<i>A1S_2378</i>	ABO12797.1	Putative ABC transporter	DOI:10.1111/j.1574-695X.2011.00926.x
<i>CarO</i>	Q155P8	Outer membrane protein	doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.08.002.
<i>OprD</i>	DOCE74	Outer membrane porin	doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.08.002.
<i>SpoU</i>	KGF60408.1	Spore coat protein SpoU	doi: 10.1128/genomeA.00824-15.
<i>SecA</i>	KFC05107.1	Preprotein translocase, SecA subunit	doi:10.1128/IAI.02925-14.
<i>PmrB</i>	ALT31689.1	Colistin resistance due to altered LPS change	doi:10.1016/j.diagmicrobio.2015.03.013.
<i>LpsB</i>	AJF80428.1	LPS biosynthesis	doi:10.1128/mBio.01163-14.
<i>gacA</i>	ADX01920.1	Response regulator GacA (Global antibiotic and cyanide control protein, LuxR/UhpA family)	doi:10.1073/pnas.1523116113.
<i>lipA</i>	KJG94176.1	Lipasa	doi:10.1128/JB.00622-15.
<i>AdeK</i>	OOW44246.1	AdeABC outer membrane channel subunit	doi:10.1128/mBio.00697-16.