



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS

LICENCIATURA EN CIENCIAS GENÓMICAS

Programa de Genómica Evolutiva

**Genómica comparativa de una cepa mexicana de
*Acinetobacter haemolyticus***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

Licenciada en Ciencias Genómicas

PRESENTA

Maria Semiramis Castro Jaimes

Tutores

Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos

Dr. Santiago Castillo Ramírez

Dra. Esperanza Martínez Romero

Cuernavaca, Morelos, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

A mis padres

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
I. 1. Relevancia clínica del género <i>Acinetobacter</i>	1
I. 2. El género <i>Acinetobacter</i>	2
I. 2. 1. El complejo <i>Acinetobacter calcoaceticus-baumannii</i>	2
I. 2. 2. <i>Acinetobacter haemolyticus</i>	2
I. 2. 3. Problemas de clasificación taxonómica de <i>Acinetobacter</i>	3
II. ANTECEDENTES	4
II. 1. Pruebas fenotípicas	4
II. 1. 1. Morfología de colonias	4
II. 1. 2. Aprovechamiento de nutrientes y otras pruebas fisiológicas	4
II. 1. 3. Crecimiento a distintas temperaturas	5
II. 1. 4. Pruebas de hemólisis y de gelatinasa	5
II. 1. 5. Perfiles de espectrometría de masas	5
II. 2. Pruebas de hibridación de DNA-DNA	6
II. 3. ANI	7
II. 4. Métodos basados en patrones electroforéticos en geles	7
II. 4. 1. AFLP	8
II. 4. 2. ARDRA y <i>ribotipificación</i>	8
II. 4. 3. MLEE	8
II. 4. 4. PFGE	9
II. 5. Análisis de la secuencia del 16S rRNA	9
II. 6. Análisis de <i>loci</i> únicos	10
II. 6. 1. <i>gyrB</i>	10
II. 6. 2. <i>recA</i>	10
II. 6. 3. <i>rpoB</i>	11
II. 7. MLST	11
II. 7. 1. Oxford	12
II. 7. 2. Pasteur	13

III. OBJETIVOS	14
III. 1. Objetivo general	14
III. 2. Objetivos particulares.....	14
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	14
IV. 1. Microbiológicos	14
IV. 1. 1. Extracción de DNA genómico del aislado clínico.....	14
IV. 1. 1. 1. Kit de <i>Thermo Scientific</i>	15
IV. 1. 1. 2. Kit de <i>Qiagen</i>	16
IV. 1. 2. PCR de <i>rpoB</i>	17
IV. 1. 3. Perfil de plásmidos	18
IV. 2. Secuenciación	20
IV. 3. Análisis bioinformáticos	20
IV. 3. 1. BLAST con <i>rpoB</i> parcial	20
IV. 3. 2. Ensamblés.....	20
IV. 3. 3. Anotación del genoma	21
IV. 3. 4. Cálculo de ANI.....	21
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
VI. PERSPECTIVAS	29
VII. IMÁGENES	32
Imagen 1. Gel horizontal con el perfil de plásmidos de <i>Acinetobacter haemolyticus</i> 11616 y las cepas marcadoras	33
Imagen 2. Curva con los tamaños de los plásmidos de la Figura 1	33
Imagen 3. Filogenia con la secuencia completa del gen <i>rpoB</i>	34
Imagen 4. Filogenia con el concatenado de los siete fragmentos del esquema MLST Oxford.....	35
Imagen 5. Filogenia con el concatenado de los siete fragmentos del esquema MLST Pasteur	36
Imagen 6. Mapa de calor con valores de ANIm	37
VIII. REFERENCIAS	38

I. INTRODUCCIÓN

I. 1. Relevancia clínica del género *Acinetobacter*

Las bacterias del género *Acinetobacter* se encuentran entre los Gram-negativos que causan infecciones oportunistas con mayor frecuencia en México y a nivel mundial (Boucher et al 2009, Garza-González et al 2010, Luna et al 2014, Morfin-Otero et al 2012). Principalmente causan infecciones nosocomiales; es decir, que los primeros signos y síntomas se presentaron al menos 48 horas después del ingreso del paciente al hospital (Inweregbu et al 2005). Estas infecciones se encuentran asociadas frecuentemente con la contaminación de superficies como catéteres y ventiladores (Munoz-Price y Weinstein 2008, Inweregbu et al 2005). Sin embargo, hay algunos reportes de infecciones adquiridas —en la comunidad—, es decir, fuera del ambiente del hospital (Munoz-Price y Weinstein 2008, Peleg et al 2008). Entre las enfermedades que causan los miembros del género *Acinetobacter* se encuentran: la neumonía asociada a ventiladores, la meningitis, la endocarditis, y las infecciones de heridas, de ojos y del tracto urinario (Antunes et al 2014). Además, son agentes causales de bacteremia (cuando hay bacterias en el torrente sanguíneo) y sepsis, una infección que involucra inflamación a nivel sistémico, desregulación del sistema inmune y falla orgánica (Antunes et al 2014, Pai et al 2015).

Acinetobacter baumannii es la especie del género más comúnmente aislada en el ambiente nosocomial a nivel mundial. Esta especie representa un problema serio de salud pública porque está ampliamente diseminada y muchas de sus clonas son multi-drogo-resistentes (resistentes a más de 3 clases de antibióticos diferentes) o pan-drogo-resistentes, es decir, resistentes a todos los antibióticos disponibles en una zona geográfica determinada (Boucher et al 2009, Gundi et al 2009). Por otra parte, los patógenos emergentes como *Acinetobacter haemolyticus* y otras especies de *Acinetobacter* se confunden con *A. baumannii* en muchos hospitales, debido al poder de resolución limitado de las pruebas fenotípicas que se llevan a cabo para identificarlas (Gundi et al 2009, Peleg et al 2008), tal como

se explicará a detalle en secciones posteriores. Asimismo, es importante mencionar que estas especies todavía son sensibles a una amplia gama de antibióticos, por lo que todavía no son tan peligrosas como *A. baumannii* (Peleg et al 2008, Tayabali et al 2012). Además, los miembros del complejo *A. calcoaceticus-baumannii* son patógenos emergentes en perros, gatos y caballos (Müller et al 2014).

I. 2. El género *Acinetobacter*

El género *Acinetobacter* está compuesto por cocobacilos Gram negativos, catalasa-positivos, oxidasa-negativos, no fermentadores, aerobios estrictos (Brenner et al 2005, Nemec et al 2000). Estas bacterias pertenecen al *Phylum* Proteobacteria, Clase Gammaproteobacteria, Orden Pseudomonadales, Familia Moraxellaceae (Peleg et al 2008). Si bien carecen de flagelo, pueden desplazarse por medio del nado en enjambre, del inglés *swarming* y de sacudidas, del inglés *twitching motility* (Eijkelkamp et al 2011).

I. 2. 1. El complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*

El complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* está formado por *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. pittiii*, *A. nosocomialis*, *A. seifertii*, y la genespecie entre la 3 y la 13" (Nemec et al 2015). Estas especies son muy homogéneas a nivel de pruebas fenotípicas y a veces son indistinguibles mediante la secuencia del 16S rRNA (Gundi et al 2009).

I. 2. 2. *Acinetobacter haemolyticus*

A *A. haemolyticus* se le llamó inicialmente *Achromobacter haemolyticus* y después genespecie 4 (Bouvet y Grimont 1986). Los estudios de hibridación de DNA-DNA junto con las pruebas fenotípicas, ayudaron a delimitar inicialmente a esta especie, ya que, por ejemplo, a diferencia de otros *Acinetobacter*, *A. haemolyticus*

puede hidrolizar gelatina y hacer hemólisis. Sin embargo, cabe destacar que la genoespecie 6 también presenta ese fenotipo; pero los resultados de las pruebas bioquímicas y de los experimentos de hibridación ADN-ADN evitaron que las agruparan con el mismo nombre (Bouvet y Grimont 1986). Además, hay especies nuevas descritas recientemente que también tienen capacidad hemolítica, tales como *A. beijerinckii* y *A. gyllenbergii* (Nemec et al 2009).

Por otra parte, es importante señalar que *A. haemolyticus* es la segunda especie más frecuente de *Acinetobacter* en algunos hospitales (Gundi et al 2009). Además, se encuentra en aislados ambientales de agua (Akbulut et al 2014, Içgen y Yilmaz 2014), de suelo (Mujumdar et al 2014) y de piel humana de individuos sanos (Berlau et al 1999, Patil y Chopade 2001, Yavankar et al 2007). Asimismo, hay grupos de investigación que han evaluado el potencial biotecnológico y de biorremediación de esta especie porque han encontrado cepas capaces de degradar aceites (Tayabali et al 2009).

I. 2. 3. Problemas de clasificación taxonómica de *Acinetobacter*

Dado que los miembros del complejo *A. calcoaceticus-baumannii* son muy homogéneos a nivel de pruebas fenotípicas, es difícil diferenciarlos por estos métodos; así que tanto los esquemas automatizados de pruebas bioquímicas como las pruebas no automatizadas reportan con certeza la identidad de los aislados clínicos únicamente a nivel de género (Peleg et al 2008). Por otra parte, existen todavía muchas cepas que no han sido muy estudiadas a nivel molecular. Entre ellas hay aislados clínicos, de personas asintomáticas, de animales y ambientales (Müller et al 2014).

Es importante mencionar que, contrario a otras especies del género, *Acinetobacter baumannii* ha sido ampliamente estudiada a nivel genómico. El genoma *core* de este grupo representa alrededor del 50% del genoma de estas bacterias (Touchon et al 2014), y el de las cepas clínicas también incluye factores de virulencia y genes de resistencia (Antunes et al 2014). Además, *A. baumannii* tiene un

pangenoma abierto (Antunes et al 2014), lo cual refleja las consecuencias de que la especie sea naturalmente competente; es decir, que sea propensa a adquirir genes por transferencia genética horizontal mediante transformación.

II. ANTECEDENTES

II. 1. Pruebas fenotípicas

Entre las pruebas fenotípicas más utilizadas para identificar bacterias se encuentran la morfología de las colonias en medio sólido, la capacidad de crecer a distintas temperaturas, así como la capacidad de metabolizar diferentes sustratos. El supuesto de la identificación basada en estas pruebas es que las especies consisten en grupos definidos que comparten ciertas características metabólicas.

II. 1. 1. Morfología de colonias

Las colonias de *Acinetobacter* son redondas, de bordes definidos, y pueden ser mucoides o no mucoides (Brenner et al 2005). Además, en agar McConkey son colonias rosadas-violáceas. Esta característica se considera en combinación con los perfiles obtenidos por medio de las pruebas bioquímicas o de la espectrometría de masas.

II. 1. 2. Aprovechamiento de nutrientes y otras pruebas fisiológicas

Tanto los esquemas automatizados como los no automatizados han demostrado que el género *Acinetobacter* es capaz de metabolizar una amplia variedad de compuestos. Son incluso capaces de degradar compuestos aromáticos (Brenner et al 2005). Los esquemas de identificación abarcan 34 pruebas bioquímicas (Bouvet y Grimont 1986, Nemec et al 2011), las cuales incluyen el aprovechamiento de aminoácidos y la fermentación de azúcares. Estos esquemas, principalmente en sus versiones comerciales y automatizadas, se utilizan en los

hospitales como método de rutina para la identificación taxonómica de los aislados clínicos. Sin embargo, muchas veces dan lugar a una identificación errónea a nivel de especie (Park et al 2015, Wang et al 2014).

II. 1. 3. Crecimiento a distintas temperaturas

Casi todas las especies de *Acinetobacter* pueden crecer a las mismas temperaturas. Si bien aparentemente hay algunas especies que se han podido diferenciar por no poder crecer a 37 °C, 41 °C o a 44 °C (Brenner et al 2005, Nemeč et al 2011), los resultados pueden variar dependiendo de las condiciones de cultivo y del crecimiento de las bacterias (Nemeč et al 2011).

II. 1. 4. Pruebas de hemólisis y de gelatinasa

Una forma de separar especies dentro del género *Acinetobacter* consiste en evaluar su capacidad proteolítica, es decir, conocer si pueden hacer hemólisis y degradar gelatina. Con base en esto, algunos autores separan a esas cepas de las que pertenecen al complejo *A. calcoaceticus-baumannii* (Nemeč et al 2011). Entre las cepas que son positivas a esas pruebas, se encuentran *Acinetobacter haemolyticus*, la genoespecie 6, *A. beijerinckii* y *A. gyllenbergii* (Bouvet y Grimont 1986, Nemeč et al 2009).

II. 1. 5. Perfiles de espectrometría de masas

Al someter colonias aisladas a espectrometría de masas con MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight*) se obtienen los perfiles de proteínas ribosomales, pues son las más abundantes en la célula. Es importante resaltar que cuando los aislados en cuestión se encuentran bien representados en la base de datos utilizada, o cuando el poder de resolución es menor, por ejemplo, al considerar al complejo *A. calcoaceticus-baumannii* como si fuera una unidad taxonómica, hay muy pocos casos de identificación incorrecta (Guo et al 2014).

Sin embargo, los casos de identificación incorrecta aumentan cuando se toman en cuenta criterios más estrictos. Por ejemplo, al no considerar al complejo *A. calcoaceticus-baumannii* como una unidad taxonómica, *A. berenzinae* y *A. ursingii* se han identificado erróneamente como miembros del complejo (Wang et al 2014); mientras que los verdaderos miembros del complejo no pueden resolverse a nivel de especie (Wang et al 2014) o son confundidos entre ellos, como ocurre con *A. baumannii* y *A. nosocomialis* (Jamal et al 2014).

Estos problemas de identificación incorrecta demuestran que las pruebas fenotípicas tienen un poder de resolución limitado. Además, las especies mejor caracterizadas tienen información en las bases de datos de los proveedores de pruebas automatizadas de pruebas bioquímicas y de espectrometría de masas, mientras que las especies poco estudiadas muy pocas veces pueden ser identificadas, pues carecen de información en dichas base de datos.

II. 2. Pruebas de hibridación de DNA-DNA

Los estudios de hibridación de ácidos nucleicos han sido considerados como el *estándar de oro* para definir especies bacterianas. Esta técnica consiste en evaluar la diferencia de dos puntos medios de temperatura (ΔT_m): entre la T_m del DNA 'puro' (*homoduplex*) y la T_m de la mezcla de DNA de los dos organismos bajo comparación (*heteroduplex*) (Rosselló-Móra y Amann, 2001). Para considerar a dos organismos como miembros de la misma especie, el valor de ΔT_m debe ser menor o igual a 5 °C (Janda y Abbott 2007, Rosselló-Móra y Amann, 2001). Sin embargo, ya casi nadie lleva a cabo estos experimentos porque son muy caros y complicados. Por otro lado, estos experimentos presentan el problema de que los resultados son comparables únicamente a nivel local.

II. 3. ANI

El valor promedio de identidad nucleotídica (del inglés, ANI) es una aproximación bioinformática a los experimentos de hibridación DNA-DNA. El supuesto de esta metodología es que si dos especies tienen un valor ANI mayor al 96%, pueden ser consideradas como miembros de la misma especie (Richter y Rosselló-Móra 2009). La ventaja de esta metodología es que es una alternativa a los estudios de hibridación de ácidos nucleicos y que los resultados pueden compartirse entre laboratorios. Además, permiten aprovechar los datos de genoma completo.

Hay dos maneras de calcular el valor de ANI. Una de ellas es mediante BLAST y otra –la más rápida y más robusta- utiliza MUMMER (Richter y Rosselló-Móra 2009). Es importante mencionar que los valores de ANI altos -mayores al 95%- correlacionan fuertemente con los datos experimentales de hibridación de ácidos nucleicos, independientemente de la metodología usada para calcularlo (Richter y Rosselló-Móra 2009).

Para calcular el valor ANI con BLAST, es necesario partir de los genes anotados, o fragmentar los genomas en pedazos de 1020 bases antes de buscar los genes compartidos (Richter y Rosselló-Móra 2009). La desventaja de esta metodología es que requiere tener los genes anotados. En lo que respecta a MUMMER, los fragmentos comparados son de 1024 bases con NUCMER (a nivel de nucleótidos) o con PROMER (a nivel de proteínas). Esta metodología tiene como ventaja que no es necesario anotar los genomas y que es más rápida que ANIb (Richter y Rosselló-Móra 2009).

II. 4. Métodos basados en patrones electroforéticos en geles

En general, estas pruebas consisten en visualizar en geles los patrones de digestión de enzimas que cortan pocas veces en el genoma o en delinear el perfil electroforético de enzimas de la maquinaria basal.

II. 4. 1. AFLP

La amplificación de fragmentos de longitudes polimórficas (del inglés, *Amplified Fragment Length Polymorphism*, AFLP) consiste en primero digerir el DNA genómico con enzimas de restricción tales como, HindIII, TaqI, EcoRI y MseI. Después, se ponen adaptadores en los fragmentos, y se usa ese DNA como templado para la amplificación de manera selectiva. Finalmente, se comparan los patrones de las bandas (Dijkshoorn et al 1996, Rafei et al 2014).

II. 4. 2. ARDRA y ribotipificación

El análisis de restricción de DNA ribosomal amplificado (del inglés, ARDA) se basa, tal como su nombre lo indica, en amplificar regiones que codifican para el rRNA, someterlo a digestión con enzimas de restricción y observar los perfiles de restricción en geles de agarosa (Nemec et al 2000). Una variante es la *ribotipificación*; en dicha técnica la diferencia es que para identificar los alelos se hace *Southern blot* e hibridaciones con sondas específicas (Dijkshoorn et al 1996, Rafei et al 2014).

II. 4. 3. MLEE

El análisis de perfiles electroforéticos de enzimas de la maquinaria basal (MLEE del inglés, *Multi Locus Enzyme Electrophoresis*) se basa en el supuesto que los genes que codifican para las enzimas están sujetos a selección neutral y que los cambios observados van a reflejar la historia evolutiva de las bacterias estudiadas. Para *Acinetobacter*, las enzimas estudiadas eran: aconitasa, adenilato cinasa, alcohol deshidrogenasa, fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina, catalasa, α -naftil-acetato esterasa, fumarasa, glucosa-6-fosfata deshidrogenasa, ácido glutámico-oxaloacético transaminasa, indofenol oxidasa, isocitrato deshidrogenase, lactato deshidrogenase, leucina aminopeptidasa, malato deshidrogenasa, malato deshidrogenasa descarboxílica, fosfoglucomutasa, 6-fosfogluconato deshidrogenasa, y fosfoglucona isomerasa (Seltmann et al 1995).

La técnica consiste en separar las muestras en geles de almidón al 10%, y posteriormente comparar las proteínas de interés, las cuales son teñidas de manera específica por medio de reacciones colorimétricas (Seltmann et al 1995). Para clasificar a las cepas dentro del mismo tipo electroforético es necesario que no difieran en más de una enzima; para que se encuentren en el mismo subtipo es necesario que no difieran en más de tres enzimas (Seltmann et al 1995).

II. 4. 4. PFGE

Otra técnica basada en geles es la electroforesis en campos pulsados (del inglés, *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*, PFGE), en la cual el DNA total se digiere con enzimas de restricción que cortan pocas veces en el genoma. Para el caso de *Acinetobacter*, Apal es la enzima que más se utiliza. Posteriormente, los fragmentos se resuelven mediante electroforesis en campos pulsados y los perfiles de restricción se comparan para distinguir cepas a nivel local. Si bien esta técnica se ha considerado como el *estándar de oro* de la tipificación a nivel molecular en varias especies de patógenos, presenta el problema de que la técnica se limita a estudios a nivel local.

II. 5. Análisis de la secuencia del 16S rRNA

Dado que el 16S rRNA es esencial y se encuentra en todas las bacterias, se ha utilizado ampliamente para estudiar la diversidad bacteriana. Sin embargo, esta metodología presenta varios problemas: para comenzar, no hay un consenso sobre qué regiones amplificar y hay errores en las secuencias depositadas en las bases de datos (Janda y Abbott 2007). Por otra parte, tiene un poder de resolución limitado, ya que puede resolver con certeza el estatus taxonómico de las cepas únicamente a nivel de género. Por ejemplo, no es posible distinguir a nivel de especie a los miembros de complejo *A. calcoaceticus-baumannii* por medio de la secuencia del 16S rRNA (Park et al 2015).

II. 6. Análisis de *loci* únicos

Una aproximación molecular para evitar el problema de mala identificación por 16S rRNA ha sido secuenciar la región variable de algún gen de la maquinaria basal que sea monocopia. En este caso se han propuesto varios candidatos: *gyrB*, *recA* y *rpoB*.

II. 6. 1. *gyrB*

El gen *gyrB* codifica para la subunidad estructural de la DNA girasa, una topoisomerasa de tipo II que participa en la replicación del ADN. Hay reportes de que los resultados del análisis de un fragmento interno de dicho gen son congruentes con los resultados de hibridación de DNA-DNA (Yamamoto et al 1999) y con la filogenia dada por otros *loci* tales como *rpoB* para algunas especies del género *Acinetobacter* (Krizova et al 2014). Sin embargo, ciertas mutaciones en este *locus* son determinantes de la resistencia a los antibióticos de la familia de las fluoroquinolonas (Gu et al 2015, Park et al 2011).

II. 6. 2. *recA*

Un fragmento variable del gen que codifica para una recombinasa involucrada en reparación de daño al DNA (*recA*) se propuso hace varios años para distinguir entre especies cercanas del género *Acinetobacter* (Nowak y Kur 1995); pero la principal aplicación fue para estudiar los perfiles de restricción del fragmento amplificado por PCR, y aun así hubo especies que no pudieron separarse por esa metodología (Nowak y Kur 1995). Por otro lado, los análisis de la secuencia de dichos fragmentos mostraron que la filogenia dada por *recA* es distinta de la reconstruida con *gyrB* (Krawczyk et al 2002). Esto podría deberse a que, como ya se mencionó antes, *gyrB* puede presentar mutaciones determinantes de resistencia a antibióticos, y a que *recA* –además de una recombinasa- pudiera ser un regulador de respuesta general a estrés (Aranda et al 2011), por lo que ambos genes están sujetos a presiones selectivas, algunas mediadas por antibióticos.

II. 6. 3. *rpoB*

Un fragmento variable del gen que codifica para la subunidad beta de la ARN polimerasa (*rpoB*) ha sido un buen marcador filogenético, pues permite distinguir entre especies cercanas y la filogenia es congruente con los estudios de hibridación de ácidos nucleicos. Cabe destacar que distintos autores han propuesto oligonucleótidos diferentes para amplificar distintas zonas informativas del gen (Diancourt et al 2010, La Scola et al 2006, Wang et al 2014). Sin embargo, la llamada “*ina-1*” es de las más utilizadas para clasificación taxonómica en el género *Acinetobacter* (La Scola et al 2006). Por otro lado, a pesar de que en otros organismos como los miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis* hay mutaciones en *rpoB* que confieren resistencia a rifampicina y rifabutina (Berrada et al 2016), por el momento no ha habido reportes similares en *Acinetobacter*.

II. 7. MLST

El esquema del MLST, del inglés *Multi Locus Sequence Typing*, se basa en el estudio de los perfiles alélicos para las regiones variables de 7 genes de la maquinaria basal. El supuesto de la metodología es que los *loci* bajo estudio se encuentran sujetos a evolución neutral y que la cantidad de regiones amortiguará los eventos de recombinación que lleguen a afectar a algún *locus*. La metodología consiste en amplificar las regiones conservadas de siete u ocho genes de la maquinaria basal, secuenciarlas y estudiarlas con diversas herramientas. Los genes elegidos deben estar separados en el genoma para que un solo evento de recombinación no afecte a todos los *loci* al mismo tiempo. Además, deben tener una sola copia en el genoma para que los oligonucleótidos sólo amplifiquen una región por gen. Esta metodología representa una ventaja respecto a los métodos basados en geles porque las secuencias nucleotídicas se pueden compartir entre laboratorios por todo el mundo. Gracias a bases de datos dedicadas a esto, como PubMLST, esta metodología si es comparable a una escala global. Esta es una de las razones por las que el MLST es una herramienta que se utiliza ampliamente en

el análisis la diversidad bacteriana, especialmente en las especies patógenas, tales como *A. baumannii* y *Staphylococcus aureus*. El esquema de MLST se propuso inicialmente para *Neisseria meningitidis* (Maiden et al 1998); sin embargo, ha funcionado para varias bacterias patógenas, entre ellas *Acinetobacter baumannii*. Actualmente, para esta última especie, hay dos esquemas, los cuales difieren en algunos genes.

II. 7. 1. Oxford

El esquema de MLST conocido como “Oxford” se desarrolló para estudiar la estructura poblacional de aislados clínicos del complejo *A. calcoaceticus-baumannii* de hospitales de España y Alemania, así como algunos aislados de las clonas internacionales previamente reportadas mediante PFGE y AFLP (Bartual et al 2005). El tamaño de las regiones amplificadas varía de 305 a 513 bases. Los genes del esquema Oxford son: *cpn60* (una chaperonina), *gdhB* (una glucosa deshidrogenasa), *gltA* (una citrato sintasa), *gpi* (una glucosa-6-fosfato isomerasa), *gyrB* (la subunidad beta de la DNA girasa), *recA* (una recombinasa) y *rpoD* (el factor sigma 70 de la RNA polimerasa). Eligieron estos genes porque se encuentran separados en el cromosoma de *A. baylyi* ADP1, la cepa que usaron como referencia para mapear los genes. Usando este esquema, los autores encontraron que había estructura poblacional en sus aislados, y que los grupos observados en el dendrograma calculado con UPGMA eran consistentes con los que obtenían con PFGE y AFLP. Además, las especies diferentes se encontraban en grupos distintos e independientes (Bartual et al 2005).

Si bien en el estudio inicial del MLST de Oxford concluyeron que los genes elegidos eran adecuados para estudiar diversidad en *A. baumannii* (Bartual et al 2005), hay evidencia de que dos de esos genes (*gyrB* y *gpi*) están sujetos a recombinación (Hamouda et al 2010), pues la topología de los árboles de esos genes por separado es inconsistente con la filogenia de especies, lo cual podría deberse a transferencia genética horizontal. Además, es posible que *gpi* no sea un buen indicador de diversidad, pues ese *locus* llega a presentar alrededor del doble

de alelos diferentes en comparación con los demás genes (Wang et al 2013). Sin embargo, no se sabe qué tanto afecten los eventos de recombinación a la resolución del esquema de MLST Oxford, pues a pesar de los problemas de *gyrB* y *gpi*, varios estudios han demostrado que la estructura poblacional de *A. baumannii* es clonal, y que hay tres clonas predominantes a nivel mundial (Antunes et al 2014, Hamouda et al 2010).

II. 7. 2. Pasteur

El esquema de MLST conocido como —Pasteur” también fue diseñado para evaluar estructura poblacional y diversidad dentro de las clonas internacionales del complejo *A. calcoaceticus-baumannii*, identificadas previamente mediante AFLP y ribotipificación (Diancourt et al 2010). Los fragmentos amplificados varían de 297 a 633 bases. Los genes del esquema Pasteur son: *cpn60* (una chaperonina), *fusA* (un factor de elongación), *gltA* (una citrato sintasa), *pyrG* (una CTP sintasa), *recA* (una recombinasa), *rplB* (una proteína ribosomal 50S de la subunidad larga L2) y *rpoB* (la subunidad beta de la RNA polimerasa). Los autores del estudio inicial del MLST Pasteur no encontraron estructura poblacional dentro de *A. baumannii* con árboles filogenéticos de máxima verosimilitud, pues los aislados no se separaban claramente dentro de la especie. Más bien, observaron que los genes del MLST permitían la separación de las especies del complejo *A. calcoaceticus-baumannii*. Sin embargo, encontraron que los grupos previamente reportados de las —clonas internacionales” de la 1 a la 3 también se separaban dentro de *A. baumannii* cuando los analizaron con árboles de expansión mínima (Diancourt et al 2010).

Si bien en el estudio inicial del MLST Pasteur se reporta que la topología de los árboles con *rplB* es inconsistente con la filogenia de especies en algunas ocasiones (Diancourt et al 2010), otros estudios han demostrado que los aislados de *A. baumannii* se agrupan principalmente en tres clonas internacionales cuando usan ese esquema de MLST (Zarrilli et al 2013). Esto último es consistente con lo reportado por estudios hechos con el esquema Oxford del MLST, pues además las clonas son equivalentes (Zarrilli et al 2013).

III. OBJETIVOS

III. 1. Objetivo general

Dado que *A. haemolyticus* es un patógeno emergente, que ha sido poco estudiado, y que se confunde frecuentemente con otras especies de *Acinetobacter* en los hospitales, el objetivo del presente trabajo consiste en definir si *A. haemolyticus* es un grupo coherente y definido, independiente de *Acinetobacter baumannii* y de otros miembros del complejo *calcoaceticus-baumannii*.

III. 2. Objetivos particulares

Primero, corroborar el estatus taxonómico de un aislado clínico mexicano de *Acinetobacter* para evaluar si realmente podría ser un miembro de la especie de *A. haemolyticus*, un patógeno emergente y oportunista. Después, ensamblar y anotar el genoma completo de este aislado para permitir comparaciones con la secuencia de varias regiones y a nivel de genoma completo. Finalmente, hacer análisis de genómica comparativa entre ese aislado, varios genomas secuenciados disponibles en NCBI y la secuencia de otras dos cepas mexicanas que pertenecen a la especie *A. haemolyticus*.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV. 1. Microbiológicos

IV. 1. 1. Extracción de DNA genómico del aislado clínico

Estudié un aislado de una paciente de Oncología Médica del Instituto Nacional de Cancerología de la Ciudad de México. La fecha del aislado fue del 3 de febrero de 2012, y la fuente fue un hemocultivo. El hospital indicó que se trataba de *Acinetobacter baumannii*. Resembré tres veces la colonia aislada para asegurar su pureza. Cabe destacar que durante ese proceso de purificación no hubo pérdida

de plásmidos. Después, mantuve la colonia purificada en glicerol al 40% a -80 °C. De ese *stock* sembré la cepa cada vez que necesité usarla.

Para obtener ADN, piqué una colonia aislada para inocular un matraz de 100 mL de LB líquido que incubé toda la noche a 37 °C, con agitación constante (250 rpm). El kit que use para aislar el DNA dependió del objetivo. Para levantar el fragmento variable de *rpoB* y la secuenciación con Illumina, usé un kit de Thermo Scientific (*Genomic DNA Purification kit*); mientras que para la secuenciación con PacBio, usé un kit de Qiagen (*Puregene Yeast/Bact Kit B*).

IV. 1. 1. 1. Kit de *Thermo Scientific*

Para este protocolo utilicé cuatro pastillas de células obtenidas con 3 mL de cultivo cada una (4 tubos *ependorf* de 1.5 mL 2 veces cada uno) y el *Genomic DNA Purification kit #K0512* de Thermo Scientific. Seguí las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones. El protocolo que implementé es el siguiente:

1. Resuspender pastillas en 200 uL de Tris-EDTA pH8 (10:1).
2. Añadir 400 uL de solución de lisis del kit. Agitar con fuerza. Nota: el contenido del tubo se va a aclarar como indicador de lisis.
3. Incubar 60 min a 65 °C en el termomixer.
4. Añadir 600 uL de cloroformo. Mezclar con fuerza por inversión.
5. Centrifugar 30 min a máxima velocidad o hasta que se separen bien las fases.
6. Tomar la parte superior, sin tocar ni jalar la interfase y poner ese sobrenadante en tubos nuevos.
7. Agregar al sobrenadante ~~pro~~ 720 uL de H₂O estéril y 80 uL de solución de precipitación del kit. Agitar con fuerza hasta que se vean hilillos blancos.
8. Centrifugar 5 min a máxima velocidad y descartar el sobrenadante.
9. Resuspender la pastilla en 100 uL de solución de NaCl del kit.
10. Agregar 3 uL de RNaseA a 0.4 mg/mL. Incubar 30 min a 37 °C.
11. Añadir 300 uL de etanol absoluto frío. Guardar a -20 °C *overnight*.

12. Centrifugar 10 min a máxima velocidad. Descartar el sobrenadante.
13. Agregar 300 uL de etanol al 70%.
14. Centrifugar 5 min a máxima velocidad. Descartar sobrenadante.
15. Dejar la pastilla secarse a temperatura ambiente no más de 5 min.
16. Disolver en 50 uL de H₂O tibia.
17. Juntar todo en un solo tubo.
18. Centrifugar 30 min a máxima velocidad. Pasar el sobrenadante a un nuevo tubo. Descartar la pastilla.

IV. 1. 1. 2. Kit de Qiagen

Para este protocolo utilicé cuatro pastillas de células obtenidas con 1.5 mL de cultivo cada una (4 tubos *ependorf* de 1.5 mL una vez cada uno) y el kit de Qiagen *Puregene Yeast/Bact. Kit B* con el protocolo *Gentra Puregene: Gram Negative* para extraer gDNA. Seguí las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones. El protocolo que implementé es el siguiente:

1. Lavar las pastillas con suero fisiológico estéril (NaCl 0.9%).
2. Añadir 300 uL de la solución de lisis del kit y mezclar pipeteando con cuidado para evitar que se formen burbujas. Incubar 5 min a 80 °C.
3. Agregar 1.5 uL de la solución de RNaseA del kit o 3 uL de RNaseA a 0.4 mg/mL. Mezclar 25 veces por inversión. Incubar 1 hora a 37 °C.
4. Incubar en hielo unos minutos para enfriar rápidamente los tubos.
5. Añadir 100 uL de la solución de precipitación de proteínas. Vortexear vigorosamente 20 seg a alta velocidad.
6. Centrifugar 30 min a máxima velocidad.
7. Poner en tubos nuevos 300 uL de isopropanol y agregar el sobrenadante.
8. Mezclar suavemente por inversión 50 veces.
9. Centrifugar 10 min a máxima velocidad y descartar el sobrenadante.
10. Añadir 300 uL de etanol al 70% y mezclar por inversión.
11. Centrifugar 1 min a máxima velocidad.

12. Descartar el sobrenadante. Dejar secar la pastilla a temperatura ambiente máximo 5 min.
13. Resuspender cada una de las pastillas en 100 uL de H₂O. Pipetear suavemente con una punta cortada.
14. Juntar todo en un solo tubo. Incubar *overnight* a temperatura ambiente.
15. Centrifugar 30 min a máxima velocidad. Pasar el sobrenadante a un nuevo tubo. Descartar la pastilla.

IV. 1. 2. PCR de *rpoB*

Amplifiqué el fragmento variable de *rpoB* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, PCR) con los oligonucleótidos que amplifican la “*ana-1*” (La Scola et al 2006). Los oligos que utilicé fueron:

Oligo Forward: 5'- TAY CGY AAA GAY TTG AAA GAA G

Oligo Reverse: 5'- CMA CAC CYT TGT TMC CRT GA

Ajusté la reacción a un volumen final de 50 uL. Usé una mezcla de dNTPs de Thermo Scientific, la ADN polimerasa *Taq Platinum* y oligonucleótidos a una concentración de 5 picomolar/uL. Dicha reacción consistió en: 4 uL DNA, 1 uL dNTPs, 5 uL buffer 10x, 2 uL MgSO₄ 50 mM, 5 uL oligo *forward*, 5 uL oligo *reverse*, 0.2 uL *Taq Platinum* y 27.8 uL H₂O.

Las condiciones para PCR fueron:

Desnaturalización inicial de 94 °C 5 min,

35 ciclos de: 94 °C 30 seg, 54 °C 30 seg, 72 °C 1 min,

Extensión final de 72 °C 7 min.

Verifiqué el tamaño esperado con un gel de agarosa al 1% (5 uL de producto de PCR + 5 uL buffer de carga). Después, purifiqué el producto de PCR con el *GeneJET PCR Purification Kit #K0702* de Thermo Scientific de acuerdo a las

instrucciones del fabricante. De esta manera se remueven sales, dNTPs, oligonucleótidos y proteínas.

IV. 1. 3. Perfil de plásmidos

Utilicé la técnica de Eckhardt (Eckhardt 1978) con algunas modificaciones para visualizar el perfil de plásmidos de tres cepas cuyos plásmidos fungieron como marcadores de peso, y de *A. haemolyticus* 11616 con el fin de determinar el número y tamaño aproximado de los plásmidos que contiene.

Las cepas y plásmidos marcadores fueron:

Cepa	Tamaño de los plásmidos (Kb)	Referencia
<i>Rhizobium etli</i> CE3 Δ 5	642, 371, 250, 194, 184, 60.7	Landeta et al 2011
<i>Escherichia coli</i> DH5 α con PSRK Tc ^R	6.2	Khan et al 2008
<i>Escherichia coli</i> DH5 α con pMOB	1.8	Strathmann et al 1991

El protocolo del gel horizontal para conocer el perfil de plásmidos consistió en:

1. Poner un cultivo *overnight* de una colonia aislada en 3 mL de LB líquido.
2. Preparar un gel horizontal a 0.75% de agarosa TB 1X.
3. Medir densidad óptica (D.O.) a 620 nm de los. Poner en un tubo eppendorf el volumen necesario de cultivo para tener una D.O. de 0.2 en 1 mL; pero no hacer la dilución.
4. Obtener pastilla luego de centrifugar 6-8 minutos a 14 000 rpm. A partir de aquí todo se hace en hielo.

5. Resuspender la pastilla en 0.5 mL de H₂O estéril fría. Disolver pipeteando.
6. Añadir muy suavemente por la pared del eppendorf 1 mL de solución de Sarcosil al 0.3 %.
7. Centrifugar 6 minutos a 14 000 rpm y descartar el sobrenadante.
8. Agregar 80 uL de ficoll (20% en TE 10:1). Dejar la muestra en hielo 15 minutos.
9. Colocar el gel en la cámara y agregar TB 1X hasta que toque el gel sin cubrir los pozos.
10. Agregar a cada pozo 30 uL de SDS al 10%.
11. Correr el gel a 100 volts durante 15 minutos con el polo negativo invertido.
12. En el cuarto frío agregar TB 1X a la cámara hasta cubrir el gel.
13. Preparar alícuotas de 230 uL de solución de lisis (RNAsa 0.4 mg/mL en TE + 1 mg/mL de azul de bromofenol) y un *stock* fresco de lisozima (10 mg/mL en H₂O). Después, añadir 80 uL de la solución de lisozima a las alícuotas de solución de lisis.
14. Resuspender cada muestra en el cuarto frío en 20 uL de la solución de lisis con lisozima. Mezclar con cuidado para no formar burbujas y cargar 30 uL de cada muestra por pozo en el gel.
15. Correr el gel a 40 volts por 90 minutos, esta vez con los polos en la orientación estándar. Posteriormente correr el gel a 100 volts por 999 minutos (aproximadamente 17 horas).
16. Teñir el gel 20 min con 200 uL de bromuro de etidio. Desteñir 20 min con agua. Visualizar.

IV. 2. Secuenciación

Antes de mandar a secuenciar, evalué la pureza de los ácidos nucleicos con *Nanodrop 2000* y su integridad –así como la ausencia de RNA— con geles de agarosa al 1% (1 uL de gDNA + 5 uL de buffer de carga, 5 uL de producto de PCR + 5 uL de buffer de carga). Envié a secuenciar el producto de PCR purificado a MACROGEN, Corea. Además, mandé a secuenciar, también a MACROGEN, con Illumina HiSeq (lecturas pareadas de tamaño 100 pb); obtuve el gDNA con el kit de Thermo Scientific. Además, envié a secuenciar el gDNA del kit de Qiagen con PacBio. Dos celdas se hicieron en MACROGEN, Corea y otro par de celdas, con Yale, USA. Las librerías filtraron para fragmentos de tamaño mayor a 20 kilobases.

IV. 3. Análisis bioinformáticos

IV. 3. 1. BLAST con *rpoB* parcial

Extraje la secuencia consenso de las lecturas de Illumina del fragmento de *rpoB* con CLC Genomics Workbench 8.5.1 (Qiagen Bioinformatics). Posteriormente, usé BLASTN (Altschul et al 1990) para verificar el estatus taxonómico de la cepa en una primera aproximación. El criterio para filtrar el mejor *hit* de BLAST fue un porcentaje de identidad mayor o igual al 99% y una cobertura mayor o igual al 70% de la secuencia.

IV. 3. 2. Ensamblés

Ensamblé las lecturas de Illumina con CLC Genomics Workbench 8.5.1 (Qiagen Bioinformatics) y parámetros default, mientras que con SPAdes 3.6.0 (Nurk et al 2013) y Velvet (Zerbino y Birney 2008) probé distintos k-meros. Las lecturas de PacBio se ensamblaron *de novo* con SMRT Analysis 2.3 (Pacific Biosciences) con el protocolo HGAP 3.0 (Chin et al 2013) y probé distintos tamaños esperados del genoma. Asimismo, llevé a cabo ensamblés híbridos con las lecturas de Illumina y PacBio con SPAdes (Antipov et al 2015, Nurk et al 2013).

Para obtener ensamblajes de buena calidad usé los siguientes criterios: maximizar el N50 y minimizar el número de contigs, que la suma de todos los contigs sea similar al tamaño esperado de un *Acinetobacter* (aproximadamente 4 millones de bases), y seleccionar replicones completos (circularizados) del tamaño esperado por el gel de perfil de plásmidos.

IV. 3. 3. Anotación del genoma

Para conocer los genes que tiene la cepa, anoté los *contigs* circularizados inicialmente con el servidor web de RAST, *Rapid Annotation using Subsystem Technology*, (Azik et al 2008) con los siguientes parámetros: sí generar modelo metabólico, anotación con el algoritmo de RAST, y sin corrección de *frameshifts*. Para la refinar la anotación de las proteínas predichas por RAST, usé la base de datos de COGs (Galperin et al 2015) y el subconjunto de proteínas bacterianas de UniProt-SwissProt (The UniProt Consortium 2015) (versión del 4 de diciembre de 2015). Los criterios para aceptar la anotación fueron: identidad mayor al 30%, cobertura mayor al 80% y que se tratara de un *bidirectional best hit*.

Posteriormente, para refinar la anotación de los genes de resistencia a antibióticos, usé el servidor web de ResFinder (Zankari et al 2012). Finalmente, revisé la anotación de las proteínas de inicio de la replicación de manera manual con BLASTN y BLASTX (Altschul et al 1990) para cada uno de los *contigs* que posiblemente corresponden a plásmidos.

IV. 3. 4. Cálculo de ANI

Para comenzar, descargué la secuencia de los genomas elegidos en el sitio FTP de NCBI para las bacterias del género *Acinetobacter* (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/genbank/bacteria/>).

Primero hice un análisis preliminar en el que elegí dos genomas completos al azar de cada una de las especies de *Acinetobacter* disponibles en NCBI, y uno cuando

no había más disponibles. Después, tomé dos genomas de cada miembro del complejo *A. calcoaceticus-baumannii* con los siguientes criterios:

- 1- Que el genoma estuviera cerrado o fuera el mejor *draft*.
- 2- Que éste representara grupos diferentes de la especie, donde me basé en el dendrograma que calcula NCBI con BLAST.
 - a. Para el caso de *A. baumannii*, elegí a un representante del complejo clonal 1 y a uno del complejo clonal 2.
 - b. Para *A. haemolyticus* elegí a todas las cepas secuenciadas disponibles en NCBI bajo el nombre de esa especie. Además, incluí a una *A. sp.* que en el análisis preliminar se había agrupado con *A. haemolyticus*. Asimismo, incluí el genoma completo de la cepa del presente estudio y al genoma de otros dos aislados mexicanos a nivel de *draft*.

Los números de acceso y los nombres de la cepa se resumen en la siguiente tabla. Cabe señalar que las cepas mexicanas no están depositadas en *genbank* y por lo tanto no cuentan con un identificador del ensamble (NA). Además, indico con un asterisco los casos de identificación incorrecta dentro de NCBI, tal como se detalla en la sección de Resultados y Discusión.

Especie indicada en genbank	Cepa	Identificador del ensamble
<i>A. haemolyticus</i>	11616	NA
<i>A. haemolyticus</i>	10633	NA
<i>A. haemolyticus</i>	INNSZ174	NA
<i>A. haemolyticus</i>	ATCC 19194	GCA_000164055.1
<i>A. haemolyticus</i>	TG21157	GCA_000301715.1
<i>A. haemolyticus</i>	TG19599	GCA_000302315.1
<i>A. haemolyticus</i>	TG19602	GCA_000309035.1
<i>A. haemolyticus</i>	CIP 64.3	GCA_000369065.1
<i>A. haemolyticus</i>	NIPH 261	GCA_000369085.1
<i>A. haemolyticus</i>	MTCC 9819	GCA_000430205.1
<i>A. haemolyticus</i>	NBRC 109758	GCA_000830135.1
<i>A. sp. *</i>	ATCC 27244	GCA_000156555.1
<i>A. haemolyticus</i> *	JKSF06	GCA_001575095.1
<i>A. baumannii</i>	AYE	GCA_000069245.1

<i>A. baumannii</i>	ACICU	GCA_000018445.1
<i>A. nosocomialis</i>	6411	GCA_000814165.3
<i>A. nosocomialis</i>	NIPH 386	GCA_000368605.1
<i>A. pittii</i>	PHEA-2	GCA_000191145.1
<i>A. pittii</i>	AP_882	GCA_001577285.1
<i>A. seifertii</i>	NIPH 973	GCA_000368065.1
<i>A. calcoaceticus</i>	NIPH 13	GCA_000367865.1
<i>A. calcoaceticus</i>	ANC 3680	GCA_000368945.1

Después, con `pyani.py` (<https://github.com/widowquinn/pyani>) calculé los valores de ANIm entre todos los genomas en la comparación. Finalmente, grafiqué los valores de ANIm en un mapa de calor hecho con la librería `ComplexHeatmap` de R/Bioconductor (Gu 2015).

IV. 3. 5. Filogenias

Primero busqué la secuencia completa de nucleótidos del gen que codifica para *rpoB* en cada una de las cepas estudiadas con ANIm. Además, obtuve la secuencia de proteínas para la que codifica dicho *locus*. Es importante señalar que descarté las cepas con secuencias parciales de *rpoB* (*A. pittii* PHEA-2, *A. seifertii* NIPH 13 y *A. haemolyticus* NBRC 10975). Posteriormente, alineé los nucleótidos con base en el alineamiento de proteínas. Este último lo hice con Clustal Omega (Sievers et al 2011); y el primero lo realicé con RevTrans 1.4 (Wernersson y Pedersen 2003). Por otro lado, obtuve las secuencias de los fragmentos de los esquemas de MLST Oxford (Bartual et al 2005) y Pasteur (Diancourt et al 2010) por medio del servidor del *Center for Genomic Epidemiology* (Larsen et al 2012). Dado que todas las cepas estudiadas con ANIm contaban con los fragmentos enteros, todas fueron incluidas en las filogenias de ambos los esquemas del MLST. El alineamiento de las secuencias de nucleótidos de los esquemas del MLST lo hice con Clustal Omega (Sievers et al 2011).

Después, evalué los modelos de evolución con `jModelTest` (Darriba et al 2012, Guindon et al 2003) para cada uno de los alineamientos y reconstruí las filogenias

con PhyML (Guindon et al 2010) con el mejor modelo para cada alineamiento. Corrí mil pruebas de bootstrap y visualicé los árboles con FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

IV. 3. 6. Comparación entre las topologías de los árboles

Comparé los árboles generados por ambos esquemas de MLST y *rpoB*. Para esto, utilicé varias pruebas disponibles en el programa TreePuzzle (Schmidt et al 2012): Kishino-Hasegawa de una sola cola, Shimodaira-Hasegawa y pesos de la verosimilitud esperada.

La hipótesis nula de la prueba de Kishino-Hasegawa (KH) es que los árboles están igualmente soportados por los alineamientos, mientras que la hipótesis alternativa es que los árboles no están igualmente soportados. Esta prueba hace comparaciones pareadas entre los árboles (Schmidt 2009).

Por otro lado, la prueba de Shimodaira-Hasegawa (SH) evalúa si los árboles (incluyendo el de máxima verosimilitud) pueden explicar igualmente bien los alineamientos; la hipótesis alternativa es que alguno o ninguno de los árboles son igualmente buenas explicaciones de los alineamientos. Esta aproximación provee intervalos de confianza más conservadores que la prueba de Kishino-Hasegawa (Schmidt 2009, Strimmer y Rambaut 2002).

Por último, la prueba de pesos de la verosimilitud esperada (ELW, del inglés *Expected Likelihood Weights*) evalúa cuál es el árbol que mejor explica los alineamientos. Esta prueba es la más estricta y provee intervalos de confianza similares a los de la prueba de Kishino-Hasegawa; además toma en cuenta que es posible que el mejor árbol pueda no estar presente entre las topologías evaluadas (Strimmer y Rambaut 2002).

IV. 3. 7. Test de recombinación

La prueba *phi* (Bruen et al 2006), implementada en SplitsTree (Huson y Bryant 2006), también se conoce como índice de homoplasias pareadas (del inglés *Pairwise Homoplasy Index*) y es un método comúnmente usado para determinar si un gen ha experimentado eventos de recombinación. Dado que una homoplasia es un carácter compartido no homólogo, la prueba *phi* evalúa qué fenómenos explican mejor los cambios observados en un alineamiento: eventos de recombinación o mutaciones convergentes. La hipótesis nula es que no hay recombinación, y la hipótesis alternativa es que sí hay recombinación (Bruen et al 2006, White et al 2013).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El genoma de la cepa estudiada se compone por un cromosoma y seis plásmidos. Logré ensamblar y anotar el cromosoma y varios *contigs* pequeños mediante un ensamble híbrido con las 4 celdas de PacBio y las lecturas de Illumina HiSeq; mientras que un replicón grande (el plásmido de 80 kilobases) logré ensamblarlo únicamente con las 4 celdas de PacBio. Cabe destacar que el ensamble híbrido da mayor certidumbre en las secuencias en comparación con los ensambles de PacBio, pues las lecturas de PacBio brindan una menor cobertura y tienen calidades menores que las lecturas de Illumina.

Si bien el tamaño de los *contigs* es similar al esperado de acuerdo al perfil de plásmidos (**Imágenes 1 y 2**), no es idéntico. Además, como los tamaños observados en las secuencias son muy parecidos en el rango de 5 a 10 kilobases y todas tienen proteínas de inicio de la replicación, no hay certeza sobre cuál secuencia corresponda a un plásmido pequeño cerrado y cuál a la secuencia parcial de un plásmido más grande. Es por eso que habrá que aislar y secuenciar por separado cada replicón de esta cepa cuyo tamaño se encuentre en el rango de 3 a 20 kilobases.

En la **Tabla 1** se enlista la cantidad de secuencias que codifican para proteínas (CDS), tRNAs y operones ribosomales presentes en cada uno de los *contigs*. Los nombres de los contigs que representan plásmidos (o que pudieran ser el fragmento de alguno) respetan la nomenclatura utilizada en otras bacterias Gram negativas como *Rhizobium*.

El aislado estudiado tiene algunos genes de resistencia a antibióticos y todos ellos se encuentran en el cromosoma. Tales genes son: una aminoglucósido acetil-transferasa, una OXA-214, una beta-lactamasa de clase C, y una cloranfenicol acetil-transferasa. En contra parte, ninguno de los *contigs* que pudieran ser parte de plásmidos presenta genes de modificación de antibióticos.

Cabe destacar que durante el proceso de anotación manual, entre los mejores hits de BLASTN contra la nr, encontré de manera repetida algunos fragmentos del genoma *draft* del escarabajo *Dendroctonus ponderosae*. Esto podría deberse a que la secuencia de NCBI del escarabajo en realidad tenga DNA de algún *Acinetobacter*. Evidencia de esto serían algunos trabajos que han demostrado que los escarabajos tienen una gran cantidad de bacterias (Morales-Jiménez et al 2013), y que en el suelo se hayan encontrado bacterias del género *Acinetobacter* (López-López et al 2010, Mujumdar et al 2014).

Nombre	Tamaño (kilobases)	CDS	tRNAs	Operones ribosomales
cromosoma	3493.5	3373	73	6
pAhae11616-a	5.02	6	-	-
pAhae11616-b	5.92	4	-	-
pAhae11616-c	6.95	7	-	-
pAhae11616-d	7.75	9	-	-
pAhae11616-e	10.69	13	-	-
pAhae11616-f	86.61	103	-	-

Tabla 1. *Contigs* con proteínas de inicio de la replicación presentes en *A. haemolyticus* 11616.

Por otra parte, confirmé que el aislado clínico estudiado pertenece a la especie *A. haemolyticus* por medio de las filogenias de *rpoB*, ambos esquemas del MLST y con los valores de ANIm (ver **imágenes 3 a 6**). Es importante notar que encontré posibles errores de clasificación dentro de los genomas del género *Acinetobacter* en NCBI. Por ejemplo, la cepa ATCC 27244, a la cual no se le había asignado especie, es en realidad una *A. haemolyticus* de acuerdo a mis análisis; mientras que la cepa JKSF06 no es *A. haemolyticus*, sino que pertenece a la especie *A. venetianus*. Cabe señalar que también hay reportes previos de problemas de clasificación taxonómica en NCBI en bacterias marinas del género *Pseudoalteromonas* (Bosi et al 2015). Por lo anterior, resulta importante que los proyectos de secuenciación de bacterias verifiquen el estatus taxonómico de la cepa bajo estudio antes de subir la secuencia a bases de datos como NCBI, pues éstas no verifican la certeza de la asignación de la especie (Bosi et al 2015). Una aproximación rápida para lograr lo anterior, en términos de cómputo y esfuerzo, es hacer comparaciones a nivel de ANI pues ya existen varias herramientas que permiten llevar a cabo dichos análisis, tales como jSpecies (Richter y Rosselló-Móra 2009) o pyani.py (<https://github.com/widdowquinn/pyani>).

Asimismo, se observa que los genomas de *A. haemolyticus* analizados en el presente trabajo forman un grupo definido, pues sus valores de ANIm se encuentran entre el 97 y el 99%; por encima del punto de corte para delimitar especies que es 95-96% (Richter y Rosselló-Móra 2009). El mismo agrupamiento también se observa por medio de los árboles con las secuencias completas del gen *rpoB* (ver figura 2) y con el concatenado de los siete fragmentos de genes en ambos esquemas del MLST (ver figuras 3 y 4). Sin embargo, las filogenias con los genes de ambos esquemas del MLST tienen un soporte muy pobre para las ramas más internas dentro de *A. haemolyticus* y hay politomías en las ramas más internas en la topología dada por *rpoB*. Las separaciones pobremente soportadas a veces ocasionan problemas al comparar las topologías dadas por los esquemas del MLST pues, tal como se puede observar en la **Tabla 2**, generalmente se rechaza la hipótesis nula de que las topologías de los MLST sean equivalentes a

la topología dada por *rpoB* cuando $\alpha = 0.05$; sin embargo, con un punto de corte más estricto ($\alpha = 0.01$) generalmente se acepta la hipótesis nula.

Alineamiento	Árbol	KH	SH	ELW	Rechazo H0; alfa = 0.01 (p < alfa)	Rechazo H0; alfa = 0.05 (p < alfa)
Oxford MLST						
	Oxford MLST	1	1	0.9818	no	no
	Pasteur MLST	0.013	0.015	0.0182	no	sí
Pasteur MLST						
	Oxford MLST	0.027	0.036	0.0236	no	sí
	Pasteur MLST	1	1	0.9764	no	no

Tabla 2. Comparación entre las topologías dadas por los MLST Oxford y Pasteur.

Por otro lado, generalmente se rechaza la hipótesis nula de que las topologías de los MLST sean equivalentes a la topología dada por *rpoB*, incluso cuando $\alpha = 0.01$ (**Tabla 3**). Esto pudiera explicarse en parte porque el árbol de *rpoB* presenta politomías y que el alineamiento indica que hay señales de recombinación por medio de la prueba phi ($p = 5.498E-11$ en el alineamiento con todas las cepas; $p = 0.03278$ cuando consideramos únicamente a *A. haemolyticus*).

Alineamiento	Árbol	KH	SH	ELW	Rechazo H0; alfa = 0.01 (p < alfa)	Rechazo H0; alfa = 0.05 (p < alfa)
Oxford MLST						
	Oxford MLST	1	1	0.9847	no	no
	Pasteur MLST	0.012	0.197	0.0153	no	KS, ELW
	<i>rpoB</i>	0	0	0	sí	sí
Pasteur MLST						
	Oxford MLST	0.054	0.153	0.03	no	ELW
	Pasteur MLST	1	1	0.97	no	no
	<i>rpoB</i>	0	0.014	0	KS, ELW	sí
rpoB						
	Oxford MLST	0	0	0	sí	sí
	Pasteur MLST	0	0.001	0	sí	sí
	<i>rpoB</i>	1	1	1	no	no

Tabla 3. Comparación entre las topologías dadas por el gen *rpoB* completo y los esquemas de MLST Oxford y Pasteur.

Asimismo, las regiones de los MLST de *A. baumannii* no son adecuadas para estudiar la diversidad genómica de *A. haemolyticus*, pues los oligonucleótidos rara vez permiten amplificar los fragmentos en *A. haemolyticus*. Además, ambos esquemas fueron diseñados para *A. baumannii*, una especie separada de *A. haemolyticus*. Por lo anterior, ninguno de los dos esquemas del MLST cuenta con perfiles alélicos (ST) de cepas de *A. haemolyticus* depositados en sus bases de datos.

VI. PERSPECTIVAS

Dado que *A. haemolyticus* es un patógeno oportunista emergente que también se encuentra en el ambiente y en la piel humana sana, resulta importante estudiar la diversidad presente dentro de la especie. De esta manera, se podrá saber si hay características que vuelvan patógenas a las cepas ambientales y comensales, tal como es el caso de la bacteria comensal *N. meningitidis*, la cual ocasiona meningitis e infecciones respiratorias cuando adquiere determinantes de patogenicidad por transferencia genética horizontal o cuando presenta mutaciones en genes reguladores dentro del genoma *core* que modulan la virulencia (Schoen et al 2008). Otro escenario posible es que cualquier cepa ambiental sea capaz de infectar a las personas inmunocomprometidas, como sucede con *Klebsiella pneumoniae*, donde la infección depende más de factores que vuelvan propenso al hospedero (como ser un paciente inmunocomprometido) que de los determinantes de patogenicidad (Holt et al 2015).

Cabe destacar que la información sobre el tamaño y número esperado de plásmidos permite evaluar con mayor certidud la calidad del ensamble en términos biológicos, es decir, saber si los *contigs* en realidad representan a algún plásmido. Así que, dado que no hay certeza en los ensamblajes para los replicones en el rango de 3 a 20 kilobases, habrá que secuenciarlos por separado. Para aislar cada plásmido utilizaré un sistema de mutagénesis *in vivo* (Martinez-Garcia et al 2011, Vosman et al 1991), el cual tenga un transposón que porte un origen de

replicación para otro organismo como *Escherichia coli* y un marcador de resistencia a antibióticos para aquellos a los que sea sensible la cepa silvestre de *A. haemolyticus* 11616. Primero, habrá que electroporar a la cepa de *Acinetobacter*, después, con el DNA mutagenizado transformaré a *E. coli* DH5 α en medio con antibiótico. Enviaré a secuenciar por separado las cepas de *E. coli* que tengan únicamente un plásmido de cada tamaño esperado; aunque serán un poco más grandes que los replicones silvestres.

Por otro lado, dado que el gen *rpoB* tiene señales de recombinación, resulta importante identificar en qué regiones se encuentran esas señales, principalmente determinar si es dentro o fuera de la región usada para taxonomía. Además, resultaría útil saber si los eventos de recombinación han ocurrido únicamente entre cepas de la misma especie o si se llevan a cabo entre especies diferentes. En caso de que la recombinación se lleve a cabo entre especies distintas y en la región usada para taxonomía, habrá que usar otro *locus* para la asignación inicial de especie dentro del género *Acinetobacter*; de lo contrario, habrá más casos de identificación incorrecta.

Para estudiar la diversidad será necesario desarrollar un esquema de tipificación molecular diseñado específicamente para *A. haemolyticus*. Las regiones elegidas para tal propósito deberán ser parte del genoma *core* de la especie, no estar sujetas a recombinación y tener una tasa de cambio media. Además, será interesante estudiar a los representantes de cada clado a nivel de genoma accesorio y de elementos genéticos móviles. Entre estos últimos se encuentran claramente los plásmidos, y resultaría interesante saber si el tener muchos plásmidos es una característica propia de la especie *A. haemolyticus*. Idealmente, el conjunto de cepas a estudiar tendrá que abarcar aislados de donde se ha reportado presencia de la especie: piel humana sana, agua, suelo, infecciones nosocomiales e infecciones adquiridas en la comunidad. Por otra parte, los aislados también tendrían que provenir de diferentes partes de planeta para tener una amplia representación geográfica, así como ser de diferentes años; de tal manera, que se pueda obtener un buen estimado espacio-temporal de la

diversidad de dicha especie. Por último, y no sólo en *A. haemolyticus*, sería interesante estudiar con mayor precisión el estatus taxonómico de los aislados del género *Acinetobacter* reportados en animales y muestras ambientales. De esta manera, se podrá tener un mejor estimado de la verdadera diversidad de especies dentro del género *Acinetobacter*.

VII. IMÁGENES

PSRK T_c^R

pMob

11616

CE3 Δ5

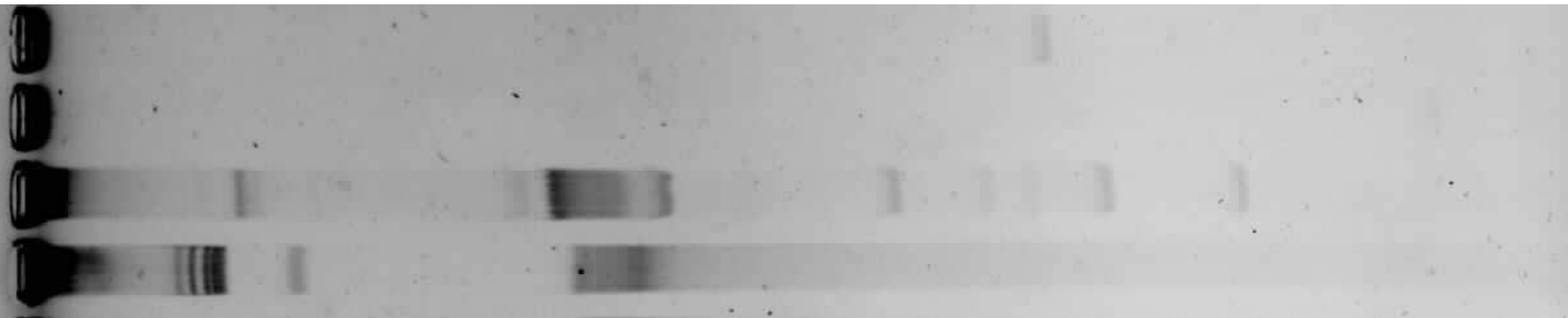


Imagen 1. Gel horizontal con el perfil de plásmidos de *Acinetobacter haemolyticus* 11616 y las cepas marcadoras enlistadas en Métodos.

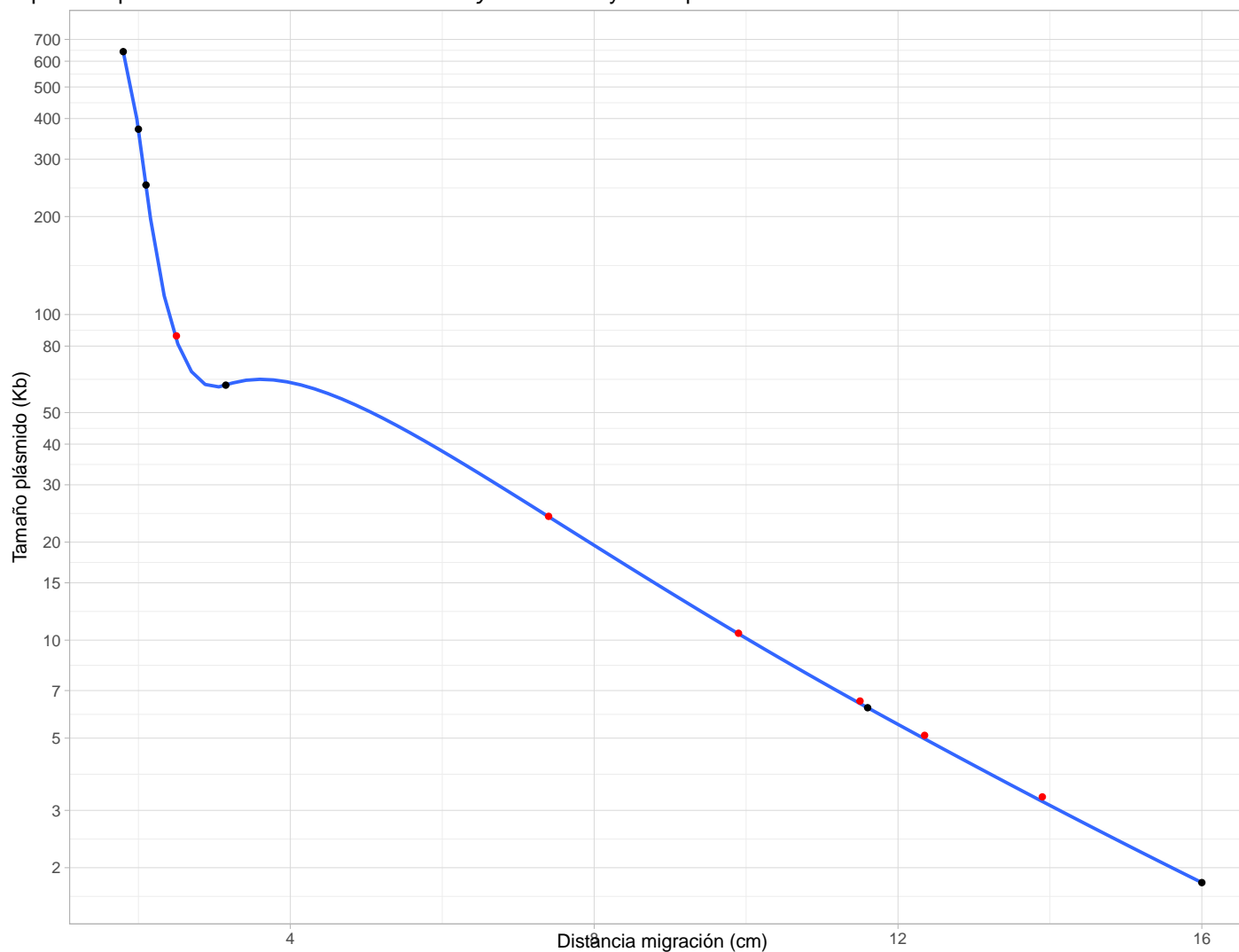


Imagen 2. Curva con los tamaños de los plásmidos de la Figura 1. En negro se encuentran los marcadores; en rojo se muestran los plásmidos de *A. haemolyticus* 11616.

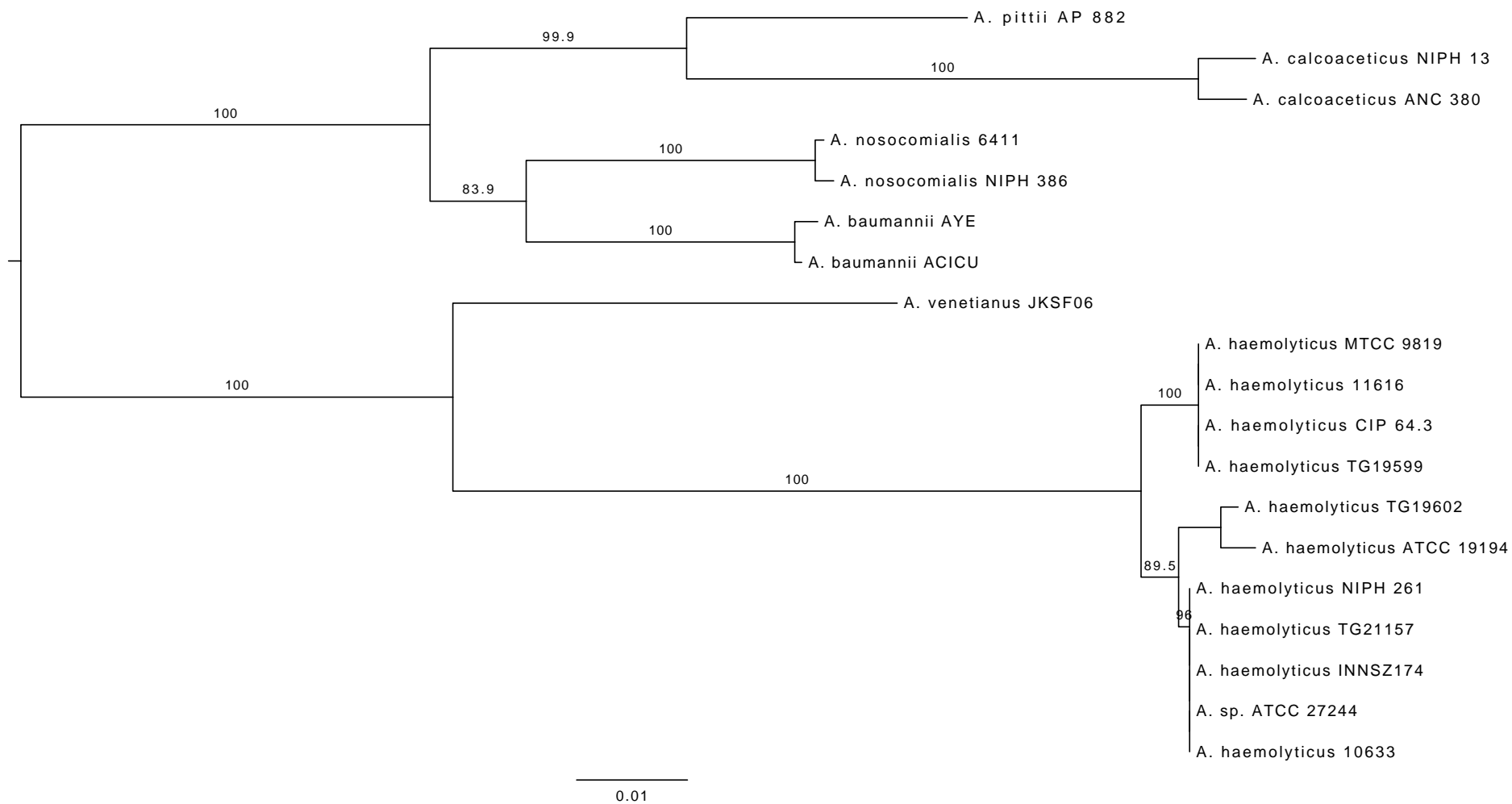


Imagen 3. Filogenia con la secuencia completa del gen *rpoB*. Los valores en las ramas son los scores de bootstrap representados como porcentajes (mil réplicas) cuando más del 50% soporta esa separación.

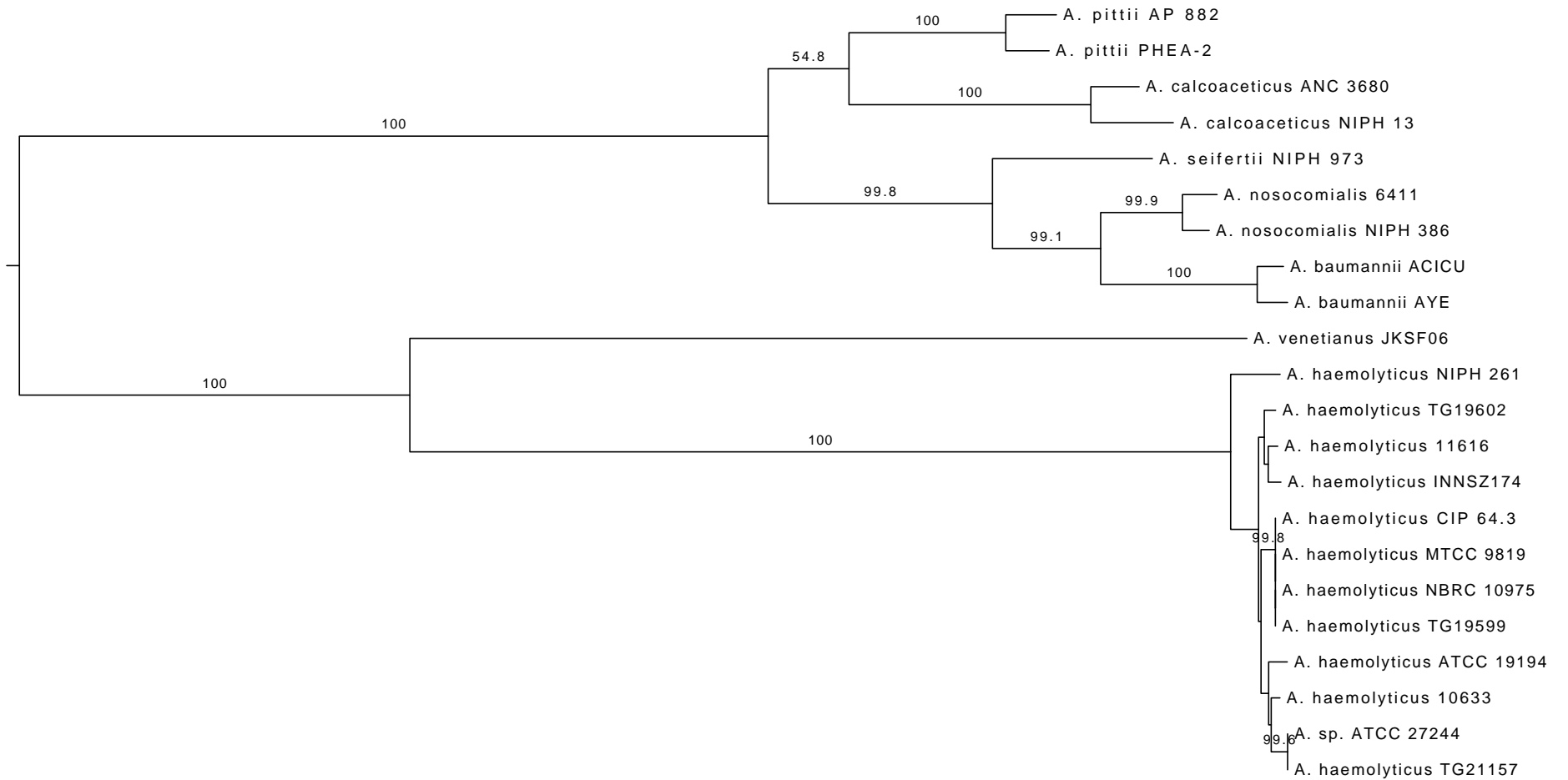


Imagen 4. Filogenia con el concatenado de los siete fragmentos del esquema MLST Oxford. Los valores en las ramas son los scores de bootstrap representados como porcentajes (mil réplicas) cuando más del 50% soporta esa separación.

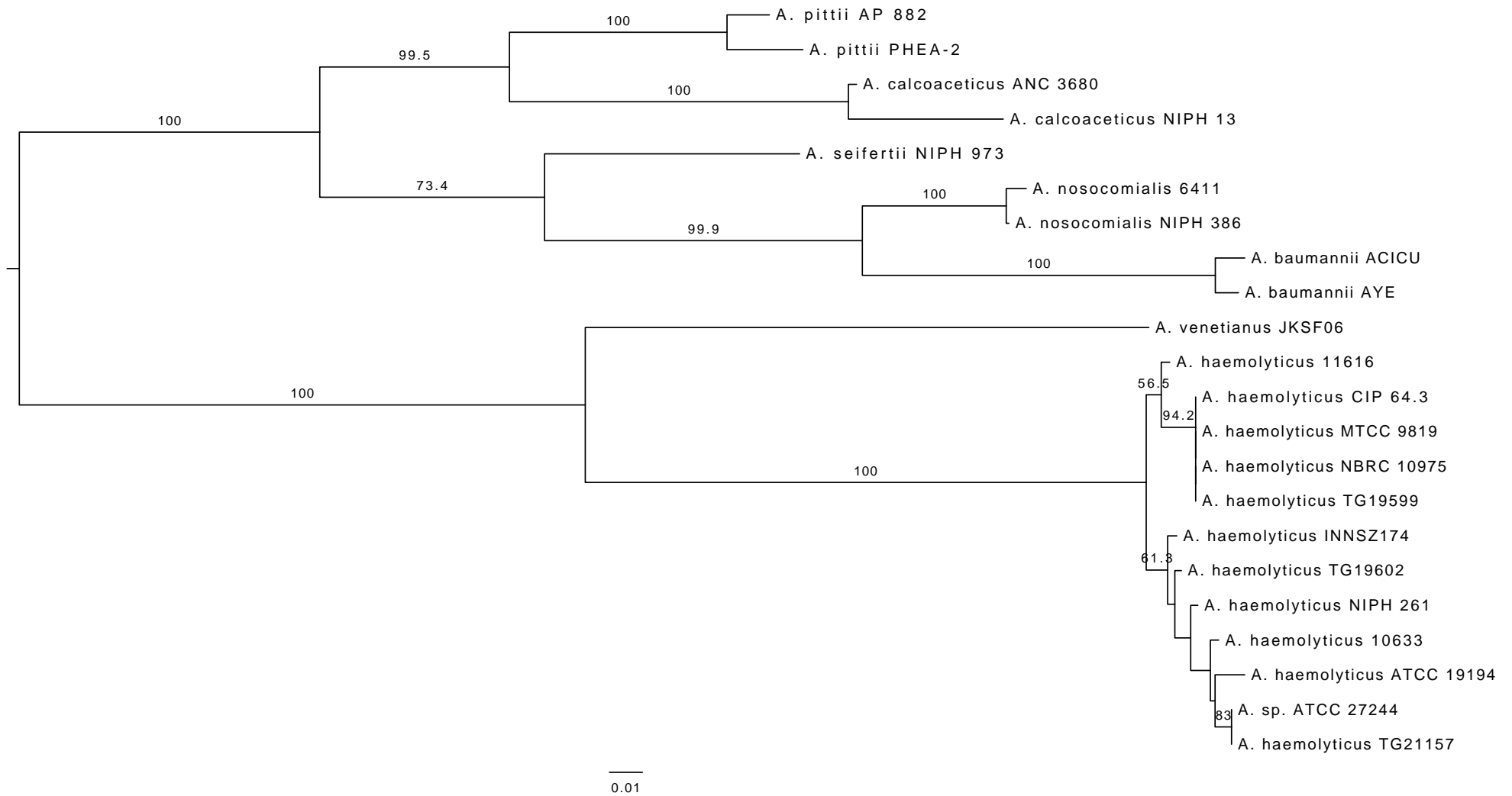


Imagen 5. Filogenia con el concatenado de los siete fragmentos del esquema MLST Pasteur. Los valores en las ramas son los scores de bootstrap representados como porcentajes (mil réplicas) cuando más del 50% soporta esa separación.

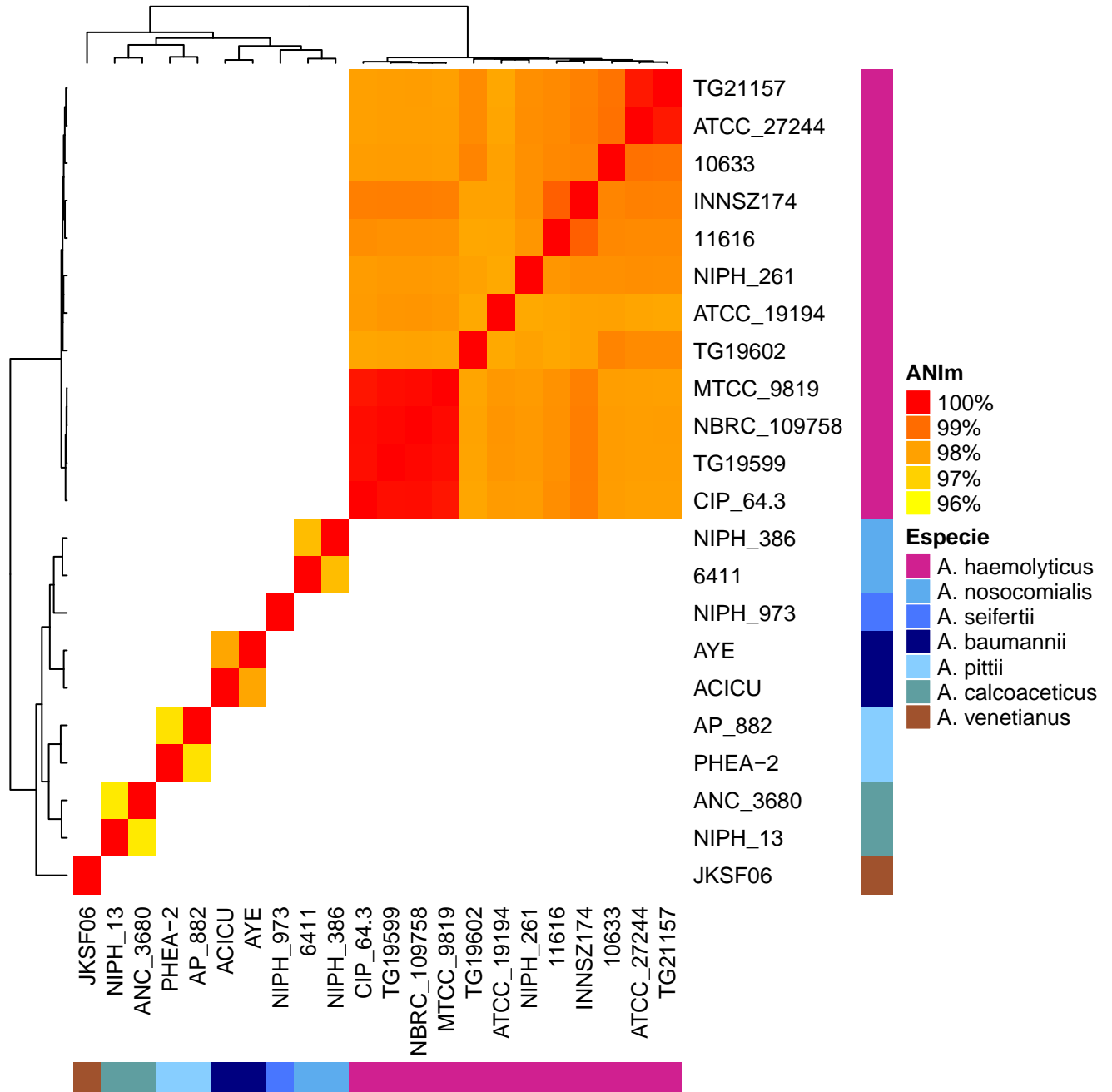


Imagen 6. Mapa de calor con los valores de ANIm para los genomas de algunos representantes del complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*, las *A. haemolyticus* disponibles en NCBI, la cepa del presente estudio, otras dos cepas mexicanas, y las cepas mal etiquetadas en NCBI.

VIII. REFERENCIAS

- Akbulut S, Yilmaz F e Icgen B (2014). Surface water isolates of hemolytic and non-hemolytic *Acinetobacter* with multiple drug and heavy metal resistance ability, *J Water Health* 12: 1-12.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW y Lipman DJ (1990). Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Antipov D, Korobeynikov A, McLean JS y Pevzner PA (2015). hybridSPAdes: an algorithm for hybrid assembly of short and long reads, *Bioinformatics* pii: btv688.
- Antunes LCS, Visca P y Towner KJ (2014). *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen, *Pathogens and Disease* 71: 292–301.
- Aranda J, Bardina C, Beceiro A, Rumbo S, Cabral MP, Barbé J y Bou G (2011). *Acinetobacter baumannii* RecA protein in repair of DNA damage, antimicrobial resistance, general stress response, and virulence, *J Bacteriol.* 193: 3740-3747.
- Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A y Zagnitko O (2008). The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology, *BMC Genomics* 9: 75.
- Bartual SG, Seifert H, Hippler C, Domínguez Luzon MA, Wisplinghoff H y 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.
- Berlau J, Aucken H, Malnick H y Pitt T (1999). Distribution of *Acinetobacter* Species on Skin of Healthy Humans, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 18: 179–183.
- Berrada ZL, Lin SG, Rodwell TC, Nguyen D, Schechter GF, Pham L, Janda JM, Elmaraachli W, Catanzaro A y Desmond E (2016). Rifabutin and rifampin resistance levels and associated rpoB mutations in clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis complex, *Diagn Microbiol Infect Dis* pii: S0732-8893(16)30001-3.

- Bosi E, Fondi M, Maida I, Perrin E, de Pascale D, Tutino ML, Parrilli E, Lo Giudice A, Filloux A y Fani R (2015). Genome-scale phylogenetic and DNA composition analyses of Antarctic *Pseudoalteromonas* bacteria reveal inconsistencies in current taxonomic affiliation, *Hydrobiologia* 761: 85-95.
- Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE Jr, Gilbert D, Rice LB, Scheld M, Spellberg B y Bartlett J (2009). Bad Bugs, No Drugs: No ESCAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America, *Clinical Infectious Diseases* 48:1–12.
- Bouvet PJM y Grimont PAD (1986). Taxonomy of the Genus *Acinetobacter* with the Recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and Emended Descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwofii*, *International Journal of Systematic Bacteriology* 36: 228-240.
- Brenner D, Krieg N, Staley J y Garrity G [eds.] (2005). Genus II. *Acinetobacter* Brisou and Prévot 1954. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Springer: 425–437.
- Bruen TC, Philippe H y Bryant D (2006). A simple and robust statistical test for detecting the presence of recombination, *Genetics* 172: 2665-2681.
- Chin CS, Alexander DH, Marks P, Klammer AA, Drake J, Heiner C, Clum A, Copeland A, Huddleston J, Eichler EE, Turner SW y Korlach J (2013). Nonhybrid, finished microbial genome assemblies from long-read SMRT sequencing data, *Nature Methods* 10: 563-569.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R y Posada D (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9: 772.
- Diancourt L, Passet V, Nemeč A, Dijkshoorn L y Brisse S (2010). The Population Structure of *Acinetobacter baumannii*: Expanding Multiresistant Clones from an Ancestral Susceptible Genetic Pool, *PLoS ONE* 5: e10034.
- Dijkshoorn L, Aucken H, Gerner-Smidt P, Janssen P, Kaufmann ME, Garaizar J, Ursing J y Pitt TL (1996). Comparison of outbreak and nonoutbreak *Acinetobacter baumannii* strains by genotypic and phenotypic methods, *J Clin Microbiol.* 34: 1519-1525.
- Eckhardt T (1978). A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acids in bacteria, *Plasmid* 1: 584- 588.

- Eijkelkamp BA, Stroehler UH, Hassan KA, Papadimitriou MS, Paulsen IT y Brown MH (2011). Adherence and motility characteristics of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates, *FEMS Microbiology Letters* 323: 44–5.
- Galperin MY, Makarova KS, Wolf YI y Koonin EV (2015). Expanded microbial genome coverage and improved protein family annotation in the COG database, *Nucleic Acids Res.* 43: D261-D269.
- Garza-González E, Llaca-Díaz JM, Bosques-Padilla FJ y González GM (2010). Prevalence of Multidrug-Resistant Bacteria at a Tertiary-Care Teaching Hospital in Mexico: Special Focus on *Acinetobacter baumannii*, *Chemotherapy* 56: 275–279.
- Gu DX, Hu YJ, Zhou HW, Zhang R y Chen GX (2015). Substitutions of Ser83Leu in GyrA and Ser80Leu in ParC Associated with Quinolone Resistance in *Acinetobacter pittii*, *Microb Drug Resist.* 21: 345-351.
- Gu Z (2015). ComplexHeatmap: Making Complex Heatmaps. R package version 1.6.0, <https://github.com/jokergoo/ComplexHeatmap>.
- Guindon S y Gascuel O (2003). A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood, *Systematic Biology* 52: 696-704.
- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W y Gascuel O (2010). New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0, *Systematic Biology* 59: 307-321.
- Gundi VAKB, Dijkshoorn L, Burignat S, Raoult D y La Scola B (2009). Validation of partial rpoB gene sequence analysis for the identification of clinically important and emerging *Acinetobacter* species, *Microbiology* 155: 2333–2341.
- Guo L, Ye L, Zhao Q, Ma Y, Yang J, Luo Y (2014). Comparative study of MALDI-TOF MS and VITEK 2 in bacteria identification, *J Thorac Dis* 6: 534-538.
- Hamouda A, Evans BA, Towner KJ y Amyes SG (2010). Characterization of epidemiologically unrelated *Acinetobacter baumannii* isolates from four continents by use of multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and sequence-based typing of bla(OXA-51-like) genes, *J Clin Microbiol.* 48: 2476-2483.
- Holt KE, Wertheim H, Zadoks RN, Baker S, Whitehouse CA, Dance D, Jenney A, Connor TR, Hsu LY, Severin J, Brisse S, Cao H, Wilksch J, Gorrie C, Schultz MB, Edwards DJ, Nguyen KV, Nguyen TV, Dao TT, Mensink M,

- Minh VL, Nhu NT, Schultsz C, Kuntaman K, Newton PN, Moore CE, Strugnell RA y Thomson NR (2015). Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health, *Proc Natl Acad Sci USA* 112: E3574- E3581.
- Icgen B y Yilmaz F (2014). Co-occurrence of antibiotic and heavy metal resistance in Kızılırmak River isolates, *Bull Environ Contam Toxicol* 93: 735–743.
- Inweregbu K, Dave J y Pittard A (2005). Nosocomial infections, *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain* 5: 14-17.
- Jamal W, Albert MH y Rotimi VO (2014). Real-time comparative evaluation of bioMerieux VITEK MS versus Bruker Microflex MS, two matrix assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry systems, for identification of clinically significant bacteria, *BMC Microbiology* 14: 289.
- Janda JM y Abbott SL (2007). 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls, *Journal of Clinical Microbiology*, 45: 2761–2764.
- Khan SR, Gaines J, Roop RM II y Farrand SK (2008). Broad-host-range expression vectors with tightly regulated promoters and their use to examine the influence of TraR and TraM expression on Ti plasmid quorum sensing, *Appl Environ Microbiol* 74: 5053-5062.
- Krawczyk B, Lewandowski K y Kur J (2002). Comparative studies of the *Acinetobacter* genus and the species identification method based on the recA sequences, *Mol Cell Probes* 16: 1-11.
- Krizova L, Maixnerova M, Sedo O y Nemecek A (2014). *Acinetobacter bohemicus* sp. nov. widespread in natural soil and water ecosystems in the Czech Republic, *Syst Appl Microbiol* 37: 467-473.
- La Scola B, Gundi VAKB, Khamis A y Raoult D (2006). Sequencing of the rpoB Gene and Flanking Spacers for Molecular Identification of *Acinetobacter* Species, *Journal of Clinical Microbiology*, 44: 827–832.
- Landeta C, Dávalos A, Cevallos MA, Geiger O, Brom S y Romero D (2011). Plasmids with a chromosome-like role in Rhizobia, *J Bacteriol* 193: 1317-1326.
- Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, Jelsbak L, Sicheritz-Pontén T, Ussery DW, Aarestrup FM y Lund O (2012). Multilocus

Sequence Typing of Total Genome Sequenced Bacteria, *J. Clin. Microbiol.* 50: 1355-1361.

López-López A, Rogel MA, Ormeño-Orrillo E, Martínez-Romero J y Martínez-Romero E (2010). *Phaseolus vulgaris* seed-borne endophytic community with novel bacterial species such as *Rhizobium endophyticum* sp. nov., *Systematic and Applied Microbiology* 33: 322–327.0020

Luna CM, Rodríguez-Noriega E, Bavestrello L y Guzmán-Blanco M (2014). Gram-Negative Infections in Adult Intensive Care Units of Latin America and the Caribbean, *Critical Care Research and Practice* 2014: 480463.

Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M y Spratt BG (1998). Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 3140–3145.

Martínez-García E, Calles B, Arévalo-Rodríguez M y de Lorenzo V (2011). pBAM1: an all-synthetic genetic tool for analysis and construction of complex bacterial phenotypes, *BMC Microbiology* 11: 38.

Morales-Jiménez J, Vera-Ponce de León A, García-Domínguez A, Martínez-Romero E, Zúñiga G y Hernández-Rodríguez C (2013). Nitrogen-Fixing and Uricolytic Bacteria Associated with the Gut of *Dendroctonus rhizophagus* and *Dendroctonus valens* (Curculionidae: Scolytinae), *Microb Ecol* 66: 200–210.

Morfin-Otero R, Tinoco-Favila JC, Sader HS, Salcido-Gutierrez L, Perez-Gomez HR, Gonzalez-Diaz E, Petersen y L Rodríguez-Noriega E (2012). Resistance trends in gram-negative bacteria: surveillance results from two Mexican hospitals, 2005–2010, *BMC Research Notes* 5: 277.

Mujumdar SS, Bashetti SP y Chopade BA (2014). Plasmid pUPI126-encoded pyrrolnitrin production by *Acinetobacter haemolyticus* A19 isolated from the rhizosphere of wheat, *World J Microbiol Biotechnol* 30: 495–505.

Müller S, Janßen T y Wieler LH (2014). Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* in veterinary medicine – emergence of an underestimated pathogen?, *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 127: 435–446.

Munoz-Price LS y Weinstein RA (2008). *Acinetobacter* Infection, *The New England Journal of Medicine*, 358: 1271-1281.

- Nemec A, Dijkshoorn L y Jezek P (2000). Recognition of Two Novel Phenons of the Genus *Acinetobacter* among Non-Glucose-Acidifying Isolates from Human Specimens, *Journal of Clinical Microbiology* 38: 3937–3941.
- Nemec A, Krizova L, Maixnerova M, Sedo O, Brisse S y Higgins PG (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.
- Nemec A, Krizova L, Maixnerova M, van der Reijden TJK, Deschaght P, Passet V, Vaneechoutte M, Brisse S y Dijkshoorn L (2011). Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU), *Research in Microbiology* 162: 393e404.
- Nemec A, Musílek M, Maixnerová M, De Baere T, van der Reijden TJ, Vaneechoutte M y Dijkshoorn L (2009). *Acinetobacter beijerinckii* sp. nov. and *Acinetobacter gyllenbergii* sp. nov., haemolytic organisms isolated from humans. *Int J Syst Evol Microbiol* 59: 118-124.
- Nowak A y Kur J (1995). Genomic species typing of cinetobacters by polymerase chain reaction amplification of the recA gene, *FEMS Microbiol Lett* 130: 327-32.
- Nurk S, Bankevich A, Antipov D, Gurevich AA, Korobeynikov A, Lapidus A, Pribelski AD, Pyshkin A, Sirotkin A, Sirotkin Y, Stepanauskas R, Clingenpeel SR, Woyke T, McLean JS, Lasken R, Tesler G, Alekseyev MA y Pevzner PA (2013). Assembling Genomes and Mini-metagenomes from Highly Chimeric Reads, *J Comput Biol.* 20: 714-737.
- Pai S, Enoch DA y Aliyu SH (2015). Bacteremia in children: epidemiology, clinical diagnosis and antibiotic treatment, *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 13: 1073-1088.
- Park G, Won-Young J, Sook-Jin J, Joong-Ki K, Ji AC, Gyun CP, Min-Jung L, Soon-Nang P, Xue ML, Seong-Sig C, Chul HJ, Seong-Ho K y Dae-Soo M (2015). Evaluation of four methods of assigning species and genus to medically important bacteria using 16S rRNA gene sequence analysis, *Microbiology and Immunology* 59: 285–298.

- Park S, Lee KM, Yoo YS, Yoo JS, Yoo JI, Kim HS, Lee YS y Chung GT (2011). Alterations of *gyrA*, *gyrB*, and *parC* and Activity of Efflux Pump in Fluoroquinolone-resistant *Acinetobacter baumannii*, *Osong Public Health Res Perspect.* 2: 164-170.
- Patil JR y Chopade BA (2001). Distribution and *in vitro* antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* species on the skin of healthy humans, *Natl Med J India.* 14: 204-208.
- Peleg AY, Seifert H y Paterson DL (2008). *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen, *Clinical Microbiology Reviews* 21: 538.
- Rafei R, Kempf M, Eveillard M, Dabboussi F, Hamze M y Joly-Guillou M-L (2014). Current molecular methods in epidemiological typing of *Acinetobacter baumannii*, *Future Microbiology* 9: 1179–1194.
- Richter M y Rosselló-Móra R (2009). Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition, *PNAS* 106: 19126-19131.
- Rosselló-Móra R y Amann R (2001). The species concept for prokaryotes, *FEMS Microbiology Reviews* 25: 39-67.
- Schmidt HA (2009). ‘Testing tree topologies’ in *The phylogenetic Handbook: a Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing*, Lemey M, Salemi M y Vandame A-M (eds.), Cambridge University Press.
- Schmidt HA, Strimmer K, Vingron M y von Haeseler A (2002). TREE-PUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing, *Bioinformatics* 18: 502-504.
- Seltmann G, Beer W, Claus H y Seifert H (1995). Comparative classification of *Acinetobacter baumannii* strains using seven different typing methods, *Zentralblatt für Bakteriologie*, 282: 372-383.
- Sievers F, Wilm A, Dineen DG, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Söding J, Thompson JD y Higgins D (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega, *Molecular Systems Biology* 7: 539.
- Strathmann M, Hamilton BA, Mayeda CA, Simon MI, Meyerowitz EM y Palazzolo MJ (1991). Transposon-facilitated DNA sequencing, *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 1247-1250.
- Strimmer K y Rambaut A (2002). Inferring confidence sets of possibly misspecified gene trees, *Proc Biol Sci.* 269: 137-142.

- Tayabali AF, Nguyen KC, Shwed PS, Crosthwait J, Coleman G y Seligy VL (2012). Comparison of the Virulence Potential of *Acinetobacter* Strains from Clinical and Environmental Sources, *PLoS ONE* 7: e37024.
- The UniProt Consortium (2015). UniProt: a hub for protein information, *Nucleic Acids Res.* 43: D204-D212.
- Touchon M, Cury J, Yoon E-J, Krizova L, Cerqueira GC, Murphy C, Feldgarden M, Wortman J, Clermont D, Lambert T, Grillot-Courvalin C, Nemec A, Courvalin P, y Rocha EPC (2014). The Genomic Diversification of the Whole *Acinetobacter* Genus: Origins, Mechanisms, and Consequences. *Genome Biology and Evolution* 6: 2866–2882.
- Vosman B, Kok R y Hellingwerf KJ (1991). Random Insertional Mutagenesis in *Acinetobacter*, en Towner KJ, Bergogne-Bérézin E y Fewson CA [eds.]. *The Biology of Acinetobacter: Taxonomy, Clinical Importance, Molecular Biology, Physiology, Industrial Relevance*, Springer: 183-189.
- Wang J, Ruan Z, Feng Y, Fu Y, Jiang Y, Wang H y Yu Y (2014). Species Distribution of Clinical *Acinetobacter* Isolates Revealed by Different Identification Techniques. *PLoS ONE* 9(8): e104882.
- Wang X, Qiao F, Yu R, Gao Y y Zong Z (2013). Clonal diversity of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates revealed by a snapshot study, *BMC Microbiol.*, 13: 234.
- Wernersson R y Pedersen AG (2003). RevTrans: Multiple alignment of coding DNA from aligned amino acid sequences, *Nucleic Acids Res.* 31: 3537-3539.
- White DJ, Bryant D y Gemmell NJ (2013). How good are indirect tests at detecting recombination in human mtDNA?, *G3 (Bethesda)* 3: 1095-1104.
- Yamamoto S, Bouvet PJ y Harayama S (1999). Phylogenetic structures of the genus *Acinetobacter* based on gyrB sequences: comparison with the grouping by DNA-DNA hybridization, *Int J Syst Bacteriol.* 49: 87-95.
- Yavankar SP, Pardesi KR y Chopade BA (2007). Species distribution and physiological characterization of *Acinetobacter* genospecies from healthy human skin of tribal population in India, *Indian Journal of Medical Microbiology* 25: 336-345.

- Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, Aarestrup FM y Larsen MV (2012). Identification of acquired antimicrobial resistance genes, *J Antimicrob Chemother* 67: 2640-2644.
- Zarrilli R, Pournaras S, Giannouli M y Tsakris A (2013). Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 41: 11– 19.
- Zerbino DR y Birney E (2008). Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs, *Genome Res* 18:821-829.