



Universidad Nacional Autónoma de México.

Doctorado en Ciencias Biomédicas

Centro de Ciencias Genómicas

“Análisis genómico de cepas representativas de brotes epidémicos de
Acinetobacter baumannii en México”

Tesis

Para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias.

Presenta:

Abraham David Salgado Camargo.

Director de Tesis:

Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos

Centro de Ciencias Genómicas, UNAM.

Comité tutor:

Dra. Esperanza Martínez Romero

Centro de Ciencias Genómicas, UNAM.

Dr. Jesús Silva Sánchez

Instituto Nacional de Salud Pública de México.

Cuernavaca, México. Mayo 2023.



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.

Agradecimientos.

El presente proyecto lo realicé gracias al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (PDCB) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), en el Centro de Ciencias Genómicas (CCG) con la matrícula 515014170, bajo la dirección del Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos.

Agradezco el apoyo recibido por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con las becas número 244044 y 253070, así mismo, doy las gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por su apoyo con la beca número 200318.

Gracias a María de los Ángeles Pérez Oseguera e Ivana Daisy Blancas Nava por su ayuda técnica para la realización del proyecto, de igual modo, a Ricardo Grande y Gloria Tanahiry Vázquez Castro por su respaldo en la secuenciación como parte de la Unidad de Secuenciación Masiva y Bioinformática (UNAM).

Contenido.

Resumen	6
Abstract	8
Introducción	10
El género <i>Acinetobacter</i> .	10
Retos en la identificación de especie (complejo <i>A. calcoaceticus-baumannii</i>).	12
<i>Acinetobacter baumannii</i> .	12
Importancia clínica.	13
Neumonía adquirida en los hospitales	14
Bacteriemia (infección del torrente sanguíneo).	14
Infecciones del tracto urinario.	15
Meningitis	15
Resistencia antimicrobiana de <i>A.</i> <i>baumannii</i> .	15
Mecanismos de resistencia en <i>A.</i> <i>baumannii</i> .	16
Mecanismos de resistencia intrínsecos.	17
Mecanismos de resistencia adquiridos.	18
Mecanismos no enzimáticos.	21
Bombas de eflujo.	21
Alteraciones en la permeabilidad.	21

Cambios en las proteínas de unión a penicilina (PBPs).	-----	22
Mecanismos de resistencia a diferentes clases de antibióticos.	-----	22
Brotos nosocomiales y factores de riesgo.	-----	24
Estudios poblacionales de <i>A. baumannii</i>.	-----	25
Epidemiología molecular.	-----	26
Electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE).	-----	26
<i>Multilocus Sequence Typing</i> (MLST).	-----	27
Epidemiología global.	-----	28
Secuenciación del genoma completo de <i>A. baumannii</i>.	-----	29
Características generales del genoma de <i>A. baumannii</i>.	-----	31
Elementos genéticos móviles asociados a la resistencia de antibióticos en <i>A. baumannii</i>.	-----	33
Islas genómicas de resistencia (AbaRs).	-----	33
Elementos transponibles.	-----	35
Secuencias de inserción (IS).	-----	35
Transposones.	-----	38
Integrones	-----	39
Plásmidos	-----	40

Inicio de la replicación y control de número de copias.	-----	42
Replicación tipo <i>theta</i>.	-----	45
Sistemas de partición.	-----	46
Sistemas toxina-antitoxina (TA).	-----	47
Sistema de Restricción-Modificación.	-----	48
Incompatibilidad plasmídica.	-----	49
Incompatibilidad por control de replicación.	-----	50
Incompatibilidad por sistemas de partición	-----	50
Conjugación y movilización plasmídica.	-----	51
Clasificación de plásmidos de <i>A. baumannii</i>	-----	52
Pregunta de investigación.	-----	55
Artículo	-----	56
Conclusiones	-----	77
Perspectivas	-----	79
Referencias	-----	80
Documentos adicionales (Genome Announcements)	-----	90

Resumen.

Introducción:

A. baumannii es reconocido ampliamente como un patógeno nosocomial importante asociado a brotes hospitalarios. Este organismo provoca infecciones letales generalmente en pacientes inmunocomprometidos, principalmente en aquellos que se encuentran en las unidades de cuidados intensivos (UCI). El tratamiento contra este tipo de infecciones es muy complicado debido a su capacidad de desarrollar resistencia contra los antibióticos de uso rutinario. El genoma de este patógeno se caracteriza por presentar una amplia plasticidad genética la cual le permite acumular una gran cantidad de determinantes de resistencia, y a su vez se asocian a otros elementos genéticos móviles que les permiten propagar la resistencia y adaptarse a diversas condiciones.

Métodos:

Analizamos la secuencia completa de 155 plásmidos de *A. baumannii* depositados en la base de datos pública NCBI provenientes de diferentes regiones geográficas y para ampliar esta diversidad añadimos las secuencias completas de 18 plásmidos mexicanos, por lo tanto, contamos con una colección de 173 secuencias de plásmidos de este organismo, con una amplia variedad de tamaños. Para determinar los diferentes linajes plasmídicos construimos una diversa gama de redes con las secuencias de cada replicón bajo criterios de cobertura e identidad. Mediante el uso de la anotación en GenBank realizamos una búsqueda rigurosa para extraer las secuencias de las proteínas Rep en cada plásmido, esto nos permitió clasificarlos en diferentes grupos de homología. Con la ayuda de herramientas bioinformáticas pudimos identificar en la colección de plásmidos, secuencias de inserción, genes de resistencia a antibióticos, sistemas de secreción, sitios *Pdif*, módulos de partición, de conjugación y de toxina-antitoxina. Finalmente, determinamos asignaciones a clases funcionales (COG) de genes homólogos para cada plásmido.

Resultados:

Los análisis bioinformáticos de este estudio nos permitieron organizar 128 plásmidos de la colección en 23 linajes clonales. Los miembros de cada linaje presentaron estructura y composición muy similar. Del conjunto de plásmidos, 138 presentaron un gen *rep* intacto, 11 mostraron pseudogenes *rep* y 27 exhibieron una replicasa no identificada.

Basados en la nomenclatura de proteínas Rep propuesta por Bertini, ampliamos el esquema de clasificación al definir 11 grupos de homología adicionales. Solo en un par de linajes (LN_7 y LN_8) pudimos identificar al operón básico del módulo de partición (*parA/parB*), el resto de los linajes exhibió el sistema incompleto o no se detectó ningún gen del módulo, mientras que el sistema Toxina-Antitoxina se detectó en 108 plásmidos distribuidos en siete linajes. El set completo de genes de la maquinaria de conjugación se presentó únicamente en miembros de dos linajes (LN_1 y LN_5), otros fueron potencialmente movilizables solo por la presencia de la relaxasa. En poco más de la mitad de nuestra colección de plásmidos logramos identificar una extensa variedad de secuencias de inserción (IS). El 34.6% de los plásmidos albergaron genes de resistencia contra diversos tipos de familias de antibióticos. Estos determinantes de resistencia los localizamos en asociación con otros elementos genéticos móviles (IS, AbaR e intrones de clase 1).

Conclusión:

Los plásmidos de *A. baumannii* de nuestra colección se agruparon en un reducido número de linajes, los cuales presentaron un contenido genético y estructura bastante estable y similar. Los plásmidos del mismo linaje presentaron proteínas Rep idénticas, por lo tanto, se clasificaron dentro del mismo grupo de homología, de esta manera cada linaje se caracterizó por representar a un grupo de incompatibilidad plasmídico. Los sistemas de partición y toxina-antitoxina fueron los únicos módulos que se detectaron en algunos linajes, es posible que el resto de los linajes utilicen sistemas alternativos a estos. Solo algunos linajes que albergaron a los plásmidos más grandes presentaron el sistema completo de conjugación, los otros que carecen de la maquinaria clásica probablemente hagan uso de un sistema diferente aun no identificado. Generalmente los plásmidos que presentaron genes de resistencia a los antibióticos estuvieron vinculados a otros elementos genéticos móviles que fueron adquiridos de manera secundaria.

Palabras clave: *A. baumannii*, proteínas Rep, genes de resistencia, plasticidad genómica, plásmidos, elementos genéticos móviles, secuenciación.

Abstract.

Introduction:

A. baumannii is widely recognized as an important nosocomial pathogen associated with hospital outbreaks. This organism causes lethal infections generally in immunocompromised patients, mainly in those in intensive care units (ICU). Treatment against this type of infection is very complicated due to its ability to develop resistance against routinely used antibiotics. The genome of this pathogen is characterized by a wide genetic plasticity which allows it to accumulate a large number of resistance determinants, which in turn are associated with other mobile genetic elements that allow them to spread resistance and adapt to various conditions.

Methods:

We analyzed the complete sequence of 155 *A. baumannii* plasmids deposited in the NCBI public database from different geographic regions and to extend this diversity we added the complete sequences of 18 Mexican plasmids, therefore, we have a collection of 173 plasmid sequences of this organism, with a wide variety of sizes. To determine the different plasmid lineages we constructed a diverse range of networks with the sequences of each replicon under criteria of coverage and identity. Using GenBank annotation we performed a rigorous search to extract the sequences of the Rep proteins in each plasmid, this allowed us to classify them into different homology groups. With the help of bioinformatics tools, we were able to identify in the plasmid collection, insertion sequences, antibiotic resistance genes, secretion systems, *Pdif* sites, partition, conjugation and toxin-antitoxin modules. Finally, we determined assignments to functional classes (COG) of homologous genes for each plasmid.

Results:

The bioinformatic analyses of this study allowed us to organize 128 plasmids from the collection into 23 clonal lineages. The members of each lineage presented very similar structure and composition. Of the plasmid set, 138 showed an intact rep gene, 11 showed rep pseudogenes, and 27 exhibited an unidentified replicase. Based on the Rep protein nomenclature proposed by Bertini, we extended the classification scheme by defining 11 additional homology groups. Only in a couple of lineages (LN_7 and LN_8) we were able to identify the basic operon of the partitioning module (*parA/parB*), the rest

of the lineages exhibited the incomplete system or no module gene was detected, while the Toxin-Antitoxin system was detected in 108 plasmids distributed in seven lineages. The complete set of conjugation machinery genes was present only in members of two lineages (LN_1 and LN_5), others were potentially mobilizable only by the presence of relaxase. In just over half of our plasmid collection we were able to identify an extensive variety of insertion sequences (IS). 34.6% of the plasmids harbored resistance genes against various types of antibiotic families. We located these resistance determinants in association with other mobile genetic elements (IS, AbaR and class 1 intgrons).

Conclusion:

A. baumannii plasmids in our collection were grouped into a small number of lineages, which presented a fairly stable and similar genetic content and structure. The plasmids of the same lineage presented identical Rep proteins, therefore, they were classified within the same homology group, thus each lineage was characterized by representing a plasmid incompatibility group. The partition and toxin-antitoxin systems were the only modules detected in some lineages; it is possible that the rest of the lineages use alternative systems to these. Only some lineages harboring the largest plasmids presented the complete conjugation system, the others lacking the classical machinery probably make use of a different system not yet identified. Generally, the plasmids that presented antibiotic resistance genes were linked to other mobile genetic elements that were acquired secondarily.

Key words: *A. baumannii*, Rep proteins, resistance genes, genomic plasticity, plasmids, mobile genetic elements, sequencing.

Introducción.

El género *Acinetobacter*.

Los miembros del género *Acinetobacter* constituyen un grupo bastante diverso de microorganismos. Actualmente se clasifica en 105 especies; de las cuales 74 poseen nombres válidos publicados, mientras que el resto aún no lo obtienen. (Nemec A, 2022).

El descubrimiento del género *Acinetobacter* data de inicios del siglo XX en donde el microbiólogo holandés Martinus Willem Beijerinck, padre de la Escuela de Microbiología de Delft (la Riviere, 1997), describió un organismo que aisló del suelo mediante un cultivo enriquecido con medio mineral de acetato de calcio, al cual denominó *Micrococcus calco-aceticus* (Dijkshoorn, 2008; Doughari, *et al.*, 2011). Posteriormente, este microorganismo se clasificó y reclasificó dentro de diferentes géneros bacterianos y no fue hasta la década de 1950 cuando se le designó dentro del género *Acinetobacter* (Jung & Park, 2015; Munoz-Price, L.S., Weinstein, R.A., 2008)

El nombre *Acinetobacter* (del griego *akinetos*, es decir, inmóvil y *bacter*, bacteria) lo acuñaron originalmente Brisou y Prevot en 1954 para distinguir dentro del grupo *Achromobacterea*, a los organismos en función de su motilidad. Este grupo es muy heterogéneo ya que alberga bacterias saprofitas Gram-negativas tanto especies oxidasa negativas como oxidasa positivas (Brisou & Prevot, 1954; Jung & Park, 2015).

En 1968 Baumann y colaboradores publicaron un estudio en el que compararon diversos caracteres fisiológicos (basados en las propiedades nutricionales y bioquímicas) de una gran cantidad de cepas de los diferentes taxones previamente mencionados. La conclusión fue que todos ellos eran parte de un sólo género, y que no existían criterios claros para hacer una subdivisión de la especie. Por lo tanto, se propuso nombrar el género *Acinetobacter* y considerar

una sola especie, denominada *Acinetobacter calco- aceticus* (Baumann, *et al.*, 1968). En 1971, el subcomité de taxonomía de *Moraxella* y bacterias relacionadas reconocieron de manera oficial al género basados en los hallazgos de Baumann. La cepa de Beijerinck descrita en 1911, sigue siendo la cepa de *Acinetobacter* documentada más antigua (Lessel EF. 1971; Baumann, *et al.*, 1968).

En 1986 se describieron doce grupos a través de estudios de hibridación ADN-ADN a los que denominaron “genoespecies” algunas recibieron nombres mientras que al resto se les asignó un número provisional (Bouvet P. & Grimont P. 1986). Un reporte posterior incluyó 5 grupos de hibridación adicionales con las designaciones del 13 – 17 (Bouvet P & Jeanjean S, 1989).

En la actualidad este género está conformado por un grupo heterogéneo de bacterias clasificadas con base a su genoma mediante estudios de hibridación previamente mencionados o por la comparación de las secuencias de sus genomas. Las genoespecies más representativas se clasificaron de la siguiente manera: *A. calcoaceticus* (= genoespecie 1), *A. baumannii* (= genoespecie 2) *A. haemolyticus* (= genoespecie 4), *A. junii* (= genoespecie 5), *A. johnsonii* (= genoespecie 7), *A. Iwoffii* (= genoespecies 8,9) y *A. radioresistens* (= genoespecie 12). Actualmente el género *Acinetobacter* se encuentra conformado por 74 especies de manera oficial (Nemec A, 2022).

El género comprende especies Gram negativas, que pertenecen a la familia Moraxelleacea, que se distinguen fenotípicamente como cocobacilos (Allen, *et al.*, 2009) Tienen un metabolismo estrictamente aerobio, son catalasa-positivo, oxidasa-negativo, no son fermentadores y no exhiben flagelos, por lo tanto, su movilidad es a través de twitching y sus genomas poseen un contenido G +C del 39-47 % (Muñoz, *et al.*, 2008; Peleg, *et al.*, 2008).

El grupo *Acinetobacter* está constituido por un conjunto de organismos saprofitos de vida libre que se pueden encontrar en casi cualquier lado y por lo tanto es posible detectarlos habitando una amplia variedad de nichos ecológicos como

podrían ser el agua, el suelo, los alimentos, las plantas, los animales y los humanos (Doughari *et al.*, 2011; Jung & Park, 2015). Un tercio de las especies del género *Acinetobacter* son capaces de colonizar los tractos respiratorios, gastrointestinales, urinarios, piel y heridas, tanto de los humanos como de una extensa gama de animales. Como consecuencia, tiene la potencialidad de provocar una amplia variedad de infecciones sistémicas, entre las que se incluyen, neumonía, septicemia e infecciones en heridas (Beggs, *et al.*, 2006)

Retos en la identificación de especie (complejo *A. calcoaceticus-baumannii*).

Muy pocos métodos son eficientes para la identificación de las especies del género *Acinetobacter*, entre estos se encuentra la hibridación ADN-ADN la cual fue clave para asignar las 12 primeras especies genómicas antes descritas y las posteriores designaciones mediante la inclusión de nuevas colecciones de cepas (Bouvet P. & Grimont P. 1986). Desafortunadamente, este sistema no es capaz de separar especies estrechamente relacionadas. Tal es el caso de *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, la genespecie 3 y 13TU. Por lo que, en 1991, Gerner-Smidt y colaboradores agruparon a estas especies en el complejo al que denominaron *A. calcoaceticus-baumannii* (complejo-ACB) (Gerner-Smidt, *et al.*, 1991). Con la designación oficial del complejo en 1992 concluyeron que estas especies son genotípicamente diferentes, pero fenotípicamente similares y son las genespecies de mayor relevancia clínica, pero no las únicas (Gerner-Smidt, 1992.)

***Acinetobacter baumannii*.**

Inicialmente *A. baumannii* se describió como un organismo propio del suelo, sin embargo, existe muy poca evidencia de que esta especie sea un residente habitual de ese medio (Hernández, *et al.*, 2010). Por el contrario, se puede aislar frecuentemente del equipo médico reusable como ventiladores mecánicos, tubos de ventilación, dispositivos de monitoreo de presión arterial, humidificadores, lavabos, urinarios de plástico, colchones, almohadas y también, en la piel del personal de salud (Kanafani & Kanj, 2014).

Acinetobacter baumannii es el miembro más importante del género debido a que se encuentra asociado particularmente a infecciones adquiridas en los hospitales a nivel mundial, con elevados índices de mortalidad (Lin & Lan, 2014). La mayoría de las infecciones causadas por este organismo ocurren en pacientes en estado crítico que han permanecido por un largo periodo (>90 días) en la unidad de cuidados intensivos (UCI) y representa hasta el 20% de las infecciones totales en estas unidades de todo el mundo (Vincent J, *et al.*, 2009)

A. baumannii tiene la habilidad de sobrevivir sobre superficies secas y en condiciones limitantes de nutrientes, lo que facilita su persistencia y transmisión en el ambiente nosocomial. Como ya se mencionó previamente, *A. baumannii* se aísla frecuentemente en los dispositivos y equipos médicos, por ello, sirven como reservorios durante brotes hospitalarios prolongados (Kanafani & Kanj, 2014). La mayoría de las cepas de esta especie persisten en ambientes secos por periodos extensos, más que otras especies bacterianas. Algunas de ellas pueden llegar a sobrevivir hasta 4 meses. Dicha característica le permite a *A. baumannii* sobrevivir en el ambiente hospitalario e influye directamente en la propagación de infecciones causadas por cepas epidémicas. De hecho, las infecciones causadas por este microorganismo en soldados y veteranos durante la guerra en Iraq no se adquirieron en el medio ambiente sino durante su ingreso a las instalaciones médicas (Lee K, *et al.*, 2011; Kanafani & Kanj, 2014).

Importancia clínica.

La mayoría de las infecciones provocadas por *A. baumannii* involucra sistemas de órganos que contienen altos niveles de fluido, como el tracto urinario, respiratorio y la cavidad peritoneal, entre otros, y que además se encuentran conectados a dispositivos médicos permanentes. Las infecciones graves provocadas por *A. baumannii* tienen un alto grado de letalidad; en promedio fallecen el 42.6% de los pacientes, pero en la UCI, la mortalidad puede alcanzar el 92%. Las infecciones más graves se encuentran asociadas a neumonía e

infecciones del torrente sanguíneo (Jung & Park, 2015; S Mohd Sazly Lim, *et al.*, 2019).

Las infecciones causadas por *A. baumannii* representan aproximadamente el 2% del total de las infecciones relacionadas con el sector salud en los Estados Unidos y Europa (Magill SS, *et al.*, 2014). Mientras que, en Asia y Medio Oriente, dichas tasas se duplican (Lob SH, *et al.*, 2016). Aún cuando las tasas de infección son más bajas en comparación con otras especies Gram-negativas a nivel mundial, el 45% de los aislamientos se consideran multidrogo resistentes (MDR), y en América Latina y algunos países del Medio Oriente, este número puede alcanzar el 70%. Estas abrumadoras cifras son aproximadamente 4 veces más altas que las observadas para otros patógenos MDR como *P. aeruginosa* y *K. Pneumoniae* de los cuales también se disponen estadísticas de vigilancia epidemiológica (Giammanco A, *et al.*, 2017).

Neumonía adquirida en los hospitales

Una gran cantidad de cepas de *A. baumannii* se aíslan de las vías respiratorias de pacientes hospitalizados. No obstante, ya es muy complicado diferenciar entre la colonización de las vías respiratorias superiores de la verdadera neumonía. La incidencia de este microorganismo varía de un sitio a otro. Sin embargo, es el segundo agente etiológico más común entre las bacterias Gram-negativas (Luna C & Aruj P, 2007). La neumonía nosocomial ocurre en las unidades de cuidados intensivos con una frecuencia del 3-5 % y con una tasa bruta de mortalidad de 30-75% (Doughari H, *et al.*, 2011).

Bacteriemia (infección del torrente sanguíneo).

La bacteriemia provocada por *A. baumannii* es comúnmente causada por catéteres infectados en el tracto respiratorio e intravascular. Por lo tanto, los factores de riesgo se asocian directamente a procedimientos invasivos y al mal uso de antibióticos de amplio espectro. Las manifestaciones clínicas no son específicas, pero ocurren frecuentemente en pacientes en estado crítico que se

encuentran en las Unidades de Cuidado Intensivo (Cisneros & Rodriguez-Bano, 2002). Las tasas de mortalidad atribuible a las infecciones del torrente sanguíneo varían entre el 34% al 43.4% en la UCI y fuera de esta unidad la tasa promedio es del 16.3% (Garnacho-Montero, *et al.*, 2015)

Infecciones del tracto urinario.

A. baumannii es el responsable de sólo el 16% de las infecciones del tracto urinario adquiridas en la UCI, en donde este organismo se encuentra ligado principalmente a infecciones asociadas con cateterismo. Por otra parte, es poco frecuente que se relacione con dichas infecciones severas en pacientes ambulatorios (Falagas M, *et al.*, 2015).

Meningitis.

La meningitis causada por cepas de *A. baumannii* MDR cada vez son más frecuentes, representa alrededor del 10% de las meningitis entre bacilos Gram-negativos y el 4% del total de estas infecciones en los hospitales (Basri R, *et al.*, 2015).

Resistencia antimicrobiana de *A. baumannii*.

Durante los últimos 30 años *A. baumannii* se ha convertido en uno de los patógenos más exitosos en el ambiente hospitalario debido a su sorprendente habilidad de adquirir resistencia contra los antibióticos de uso rutinario. Una gran cantidad de cepas de *A. baumannii* son altamente resistentes a la mayoría de los antibióticos disponibles en la actualidad, como consecuencia, genera una reducción en las opciones terapéuticas para el paciente (Lin & Lan, 2014).

Actualmente se utiliza diferente terminología para describir el grado de resistencia de diferentes aislamientos:

Cepas Multidrogo Resistentes (**MDR**): se refiere a aquellos aislamientos que son resistentes a un mínimo de tres clases de antibióticos (penicilinas, cefalosporinas y fluoroquinolonas); cepas Extremadamente Resistentes (**XDR**): son organismos MDR que presentan una resistencia adicional a carbapenémicos y solo permanecen susceptibles a una o dos clases de antibióticos; finalmente, cepas Pandrogo Resistentes (**PDR**): se define como aquellas cepas que presentan resistencia a todos los antibióticos disponibles (Jung & Park, 2015).

Mecanismos de resistencia en *A. baumannii*.

Los principales mecanismos de resistencia antimicrobiana descritos en *A. baumannii* se clasifican generalmente en cuatro categorías (Kamolvit W, *et al.*, 2015):

A) Enzimas inactivadoras de antimicrobianos: la degradación enzimática de los antibióticos β -lactámicos a través de β -lactamasas, comprende el mecanismo de resistencia más prevalente desarrollado por *A. baumannii* (Jeon J, *et al.*, 2015).

B) Alteraciones en la permeabilidad de la membrana: este tipo de resistencia se debe a la reducida expresión o mutación de las porinas de la membrana externa, las cuales generan cambios en la permeabilidad de la envoltura en este microorganismo. La resistencia a carbapenémicos en *A. baumannii* se asocia a la pérdida de las proteínas a través del canal de las porinas en la membrana (Manchanda V, *et al.*, 2010).

C) Bombas de eflujo: suelen presentar tres componentes principales, incluida a la propia bomba, presente en la membrana citoplasmática; un portal de salida (canales proteicos que atraviesan la membrana externa) y una lipoproteína enlazadora. Dicho mecanismo funciona mediante la expulsión del antibiótico del espacio periplásmico a la parte externa de la célula, de esta manera se evita que llegue a su sitio de acción. En *A. baumannii* es la responsable de la resistencia

a diferentes clases de antibióticos, como aminoglucósidos, quinolonas, cloranfenicol, tetraciclinas y bromuro de etidio e (Nowak J, *et al.*, 2015).

D) Modificación de los sitios blanco: las alteraciones en los sitios diana de los antibióticos también pueden inducir resistencia contra ellos. Se debe principalmente a la sobreexpresión de las Proteínas de Unión a la Penicilina (PBP) alteradas, que exhiben baja afinidad para ciertos antibióticos, como carbapenémicos, quinolonas, tetraciclinas, trimetoprima y aminoglucósidos (Gehrlein M, *et al.*, 1991).

Cabe resaltar que *A. baumannii* puede presentar una combinación de los diferentes mecanismos antes mencionados, como sucede en otras bacterias Gram-negativas (Fernández-Cuenca F, *et al.*, 2003).

Mecanismos de resistencia intrínsecos.

Las especies de *Acinetobacter* poseen una amplia gama de β -lactamasas que tienen la capacidad de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos. *A. baumannii* produce de manera inherente una cefalosporinasa de tipo AmpC, también conocida como *cefalosporinasa derivada de Acinetobacter* (ADC). Cuando estas enzimas se producen a nivel basal, no reducen la eficacia de las cefalosporinas de espectro extendido (Bou G, & Martínez-Beltrán J, 2000). Cabe resaltar que a diferencia de las enzimas AmpC que se encuentran en otros organismos Gram-negativos la expresión inducible no se produce en *A. baumannii*. La presencia de la secuencia de inserción ISAba1 es el determinante clave que regula la sobreexpresión de AmpC en *A. baumannii*, proporcionando un promotor eficaz. La existencia de este elemento se correlaciona con el aumento en la expresión del gen AmpC y a la resistencia a cefalosporinas de espectro extendido (Héritier C, *et al.*, 2006).

La principal causa de resistencia contra carbapenémicos en *A. baumannii* se debe a la producción de carbapenemasas de clase D (o tipo OXA). Las enzimas OXA-51 también ocurren de manera natural y se encuentran codificadas en el cromosoma de dicho microorganismo. Este tipo de enzimas se expresan de manera deficiente en su nivel basal, en la mayoría de las cepas estudiadas, lo que explica un bajo impacto en la susceptibilidad contra todos los antibióticos β -lactámicos. Similar a las ADC, la expresión de estas enzimas requiere de los elementos de inserción ISAb1 río arriba del gen. Esta sobreexpresión conduce entonces, a la resistencia a los carbapenémicos (Rice LB. 2006).

Previamente el gen OXA-51 se utilizó como herramienta para identificar aislamientos clínicos de *A. baumannii*, sin embargo, recientemente también se ha identificado en cepas de *A. nosocomialis* y *A. pittii*, por lo que se ve afectada la precisión de este gen como marcador para discriminar esta especie de otras del género (Gordon NC & Wareham DW. 2010).

Mecanismos de resistencia adquiridos.

La degradación enzimática mediada por la producción de β -lactamasas representa el mecanismo de resistencia más prevalente en *A. baumannii*.

De acuerdo a la clasificación de Ambler las β -lactamasas se dividen en cuatro grupos moleculares: Clase A, Clase B (metalo- β -lactamasas) y Clase D (Oxacilinasas), estas enzimas hidrolizan al menos carbapenémicos junto a otros β -lactámicos (Jain R & Danziger LH, 2004).

Las β -lactamasas de Clase A median la resistencia a penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos; y presentan un residuo de serina en su sitio activo. Estas enzimas pueden adquirir una actividad de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) a través de mutaciones puntuales y desarrollar resistencia contra cefalosporinas como ceftazidima, ceftriaxona, cefotaxima y aztreonam (Ghafourian S, *et al.*, 2015). Se distribuyen ampliamente entre bacterias

Gram-negativas mediante la ayuda de plásmidos y otros elementos genéticos móviles. Los genes más representativos que codifican para las enzimas de esta clase son: TEM-1, TEM-2, TEM-92, CARB5, VEB-1, PER-1 y CTX-M-2 (Tooke C, *et al.*, 2019).

Las metalo- β -lactamasas de Clase B (MBLs) pueden estar codificadas tanto en plásmidos como en cromosoma, tienen la capacidad de hidrolizar prácticamente a todos los antibióticos β -lactámicos excepto el aztreonam. Estas enzimas requieren zinc o algún otro metal pesado en su sitio activo para llevar a cabo la catálisis. En *A. baumannii* se han descrito 4 diferentes tipos de MBLs, IMP, VIM, SIM y NDM. Dado que esta clase de enzimas pueden estar situadas en elementos genéticos móviles como plásmidos que a su vez se encuentran asociados a integrones de clase 1 son fácilmente transmisibles a cepas de la misma especie o incluso a especies de géneros diferentes (Cornaglia, G, *et al.*, 2011).

Las β -lactamasas de clase D, también llamadas oxacilinasas (OXAs) tienen la propiedad de inactivar a todos los antibióticos β -lactámicos y, por lo tanto, comprende el principal mecanismo de resistencia contra carbapenémicos. Usualmente, dichas enzimas, no son inhibidas por el ácido clavulánico, sulbactam o tazobactam. Los genes que codifican para estas enzimas se pueden encontrar en cromosoma y plásmidos. Las enzimas de este grupo que son más prevalentes en aislamientos clínicos de *A. baumannii* incluyen a las familias *blaOXA-51*, *blaOXA-23*, *blaOXA-40/24*, *blaOXA-143* y *blaOXA-58*. Wong y colaboradores recientemente confirmaron que la sobreexpresión de los genes *blaOXA-51* y *blaOXA-23*, se debe a la presencia de la secuencia ISAba1 en su región promotora (Poirel, L. *et al.*, 2010; Wong, M.H., *et al.*, 2019).

Las enzimas que pertenecen a la familia *blaOXA-51* representan al conjunto más grande de enzimas presentes en *A. baumannii* conformado por 95 derivados. Como se mencionó previamente, son enzimas que se encuentran codificadas cromosómicamente y, por lo tanto, ocurren de manera natural en este organismo

Gram-negativo, eso explica su elevada prevalencia. Las enzimas que conforman este subgrupo difieren entre 1 y 15 aminoácidos (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/A9LS11/entry>; Evans B, *et al.*, 2008).

Desde que se describió por primera vez en 1985, el grupo *blaOXA-23* incluye 19 variantes reportadas a nivel global, las más representativas son OXA-49 y OXA-27. Generalmente se encuentran presentes en plásmidos de *A. baumannii*, por lo tanto, la prevalencia de cepas productoras de esta enzima es significativamente alta. (Evans B, *et al.*, 2014). Debido a su asociación con otros elementos genéticos móviles, estas enzimas también se encuentran ampliamente distribuidas en cepas de *A. radioresistens*, e incluso en especies fuera del género como *P. mirabilis* (Poirel, *et al.*, 2008a; Bonnet, *et al.*, 2002).

El primer miembro de la familia de enzimas *blaOXA-58* se describió en 2003 en Francia. Se identificó como un aislamiento clínico MDR en *A. baumannii* resistente a carbapenémicos. Hasta la fecha se han detectado tres variantes principales, OXA-96, OXA-97 y OXA-164. Los genes que codifican para este grupo de enzimas se encuentran codificados en cromosoma o plásmidos, por lo que su distribución a nivel global es muy alta. Además, se encuentran asociadas con el elemento de inserción ISAba3, lo que genera un aumento en los índices de resistencia contra carbapenémicos (Evans B & Sebastian G. 2014. Poirel L, *et al.*, 2008).

Las cepas de *A. baumannii* productoras de la familia *blaOXA-40/24*, se reportaron por primera vez en la península ibérica en 1997. Hasta el día de hoy se han reportado 6 variantes de este subgrupo, las de mayor importancia clínica son OXA-72, OXA-25 y OXA-26 por su asociación con plásmidos. Los genes de esta familia también se pueden encontrar codificados en cromosoma, generalmente pueden hidrolizar penicilinas y en menor medida cefalosporinas y carbapenémicos. Esta familia de enzimas a diferencia de las otras OXAs, no se encuentran relacionadas con secuencias de inserción. Por su parte, los genes *blaOXA-40/24* se encuentran flanqueados por las recombinasas XerC/D. Es

posible que estas secuencias movilicen a los genes a través recombinación sitio específico (Acosta J, *et al.*, 2011;Bou G, *et al.*, 2000).

En el año 2004 se describió inicialmente a la familia *blaOXA-143* proveniente de tres aislamientos clínicos de *A. baumannii* resistentes carbapenémicos en Brasil. A pesar de que OXA-143 presenta alta afinidad por carbapenémicos, muestra bajas tasas de hidrolisis contra ellos. En cambio, este grupo de enzimas es capaz de conferir altos niveles de resistencia a carbapenémicos cuando se asocia a otros mecanismos de resistencia (Evans B & Sebastian G. 2014).

Mecanismos no enzimáticos.

Bombas de eflujo.

Las bombas de eflujo están asociadas a la resistencia de una gran variedad de clases de antibióticos. Por lo general se encuentran codificados en el cromosoma. El sistema más estudiado en *A. baumannii* es la superfamilia AdeABC que se asocia a la resistencia contra tigeciclinas, aminoglucósidos y carbapenémicos. De estos últimos puede generar altos niveles de resistencia cuando se combina con las enzimas OXA (Perez F, *et al.*, 2007).

Alteraciones en la permeabilidad.

Las porinas son proteínas que forman canales y permiten el transporte de moléculas a través de la membrana externa de la bacteria. Las alteraciones en estas proteínas pueden influir de manera directa a la resistencia de antibióticos en *A. baumannii*, debido a que afectan la permeabilidad de la membrana. La reducida expresión de algunas porinas como CarO y Omp se asocian a la resistencia a carbapenémicos (Catel-Ferreira, *et al.*, 2011; Smani Y, *et al.*, 2014). La pérdida de la proteína Omp29 en cepas productoras de las carbapenememasas OXA-51-like u OXA-23-like genera una resistencia incrementada a imipenem. La porina OmpA también se relaciona con la resistencia a aztreonam, cloranfenicol y ácido nalidíxico. Un estudio mostró que OmpA y CarO interactúan físicamente con la carbapenemasa OXA-23 por lo

que se ve incrementada la resistencia contra los β -lactámicos (Wu X, *et al.*, 2016).

Cambios en las proteínas de unión a penicilina (PBPs).

En *A. baumannii* se describieron 7 diferentes tipos de PBPs (1a, 1c, 2, 3, 4, 4b y 5). La resistencia a Carbapenémicos en este macroorganismo está relacionada con la disminución en la captación del antibiótico debido a una deficiencia de porinas y a la reducción de la afinidad por el fármaco debido modificaciones de PBPs cuasadas por mutaciones, como la expresión reducida de la PBP-2 (Fernandez-Cuenca F, *et al.*, 2003; Perez F, *et al.*, 2007).

Mecanismos de resistencia a diferentes clases de antibióticos.

Aminoglucósidos. Las enzimas modificadoras de aminoglucósidos representan el mecanismo más grande resistencia a esta clase de antibióticos en *A. baumannii*. Estas enzimas se clasifican en acetiltransferasas (AAC), nucleotiltransferasas (ANT) y fosfotransferasas (APH) (Jung & Park, 2015). Los genes que codifican para dichas enzimas pueden ser transportados por elementos genéticos móviles como plásmidos, integrones, casetes genéticos y transposones, y de esta manera transferirse entre bacterias patógenas (Garneau-Tsodikova S. & Labby K.J. 2016). Aunque las enzimas modificadoras de aminoglucósidos siguen siendo el principal sistema de resistencia, las bombas de eflujo también representan un problema emergente en el uso de estos agentes. Cuando dichas enzimas se asocian con las bombas de eflujo AdeABC tienen la capacidad de generar resistencia a prácticamente toda la familia de aminoglucósidos (Xu C, *et al.*, 2019).

Quinolonas. Las alteraciones en la estructura de la DNA girasa o topoisomerasa IV a través de mutaciones en los genes *gyrA* y *parC* son la principal causa de resistencia a quinolonas en *A. baumannii*. Estos cambios disminuyen la afinidad para la unión de las quinolonas al complejo enzima-ADN (Perez F, *et al.*, 2007). Otro mecanismo de resistencia a esta clase antibióticos es causado por el

sistema de eflujo AdeABC el cual reduce la acumulación intracelular del fármaco (Potron A, *et al.*, 2015).

Tetraciclinas y glicilclinas. En *A. baumannii* existen dos tipos de resistencia contra tetraciclinas. El primer mecanismo está controlado por TetA y TetB que son bombas de eflujo mediadas por transposones específicos. TetB controla la salida de tetraciclina y minociclina, mientras que TetA solo es responsable de la salida de tetraciclina. El segundo mecanismo lo lleva a cabo el gen *tetM* que codifica para la proteína de protección ribosomal, el cual protege al ribosoma de la acción de tetraciclina, doxiciclina y minociclina (Falagas M, *et al.*, 2015). La presencia adicional de la bomba de eflujo AdeABC en este sistema contribuye a la disminución en la susceptibilidad a tigeciclina (Perez F, *et al.*, 2007).

Polimixinas. La polimixina B y E son péptidos antimicrobianos catiónicos que se unen al lípido A de la membrana externa de organismos Gram-negativos. Se aislaron por primera vez en 1947 y en la actualidad se emplean como tratamiento de última elección contra las infecciones causadas por cepas MDR de *A. baumannii* (Reis A, *et al.*, 2003). En un inicio los mecanismos de resistencia a polimixinas solo fueron cromosomales y, por lo tanto, más complicado de diseminarse (Cai Y, *et al.*, 2012). Más tarde, se describieron los genes *mcr* codificados en plásmidos que confieren resistencia a esta clase de antibióticos. Los principales mecanismos de resistencia en *A. baumannii* incluyen, a) la alteración del lípido A debido a mutaciones en el operón *pmrAB* y genes *mcr*, b) mutaciones de los genes *lpxA*, *lpxC* y *lpxD* que codifican para biosíntesis del lípido A; y c) expresión de los genes *lpsB* y *lptD* relacionados con defectos en la permeabilidad de la membrana externa (Moffatt J, *et al.*, 2019).

Trimetoprima y Sulfonamidas. Ambos antibióticos actúan inhibiendo la síntesis de ADN mediante el bloqueo de la vía del dihidrofolato. La resistencia en *A. baumannii* se debe principalmente a las dihidrofolato reductasas resistentes a trimetoprima DfrA codificadas por los genes de la familia *dfrA*, los cuales se han detectado principalmente en plásmidos y también asociados a integrones de

clase 1 como casetes de resistencia. En general, el 71.3% de los aislamientos clínicos de *A. baumannii* es intrínsecamente resistente sulfonamidas. La resistencia se debe a las dihidropteroato sintetasas codificadas por los genes *sul1* y *sul2*. La presencia de la bomba de eflujo MexAB-OprM se asocia con la disminución la susceptibilidad ambos antibióticos cuando se expresa a altos niveles.

Brotos nosocomiales y factores de riesgo.

A. baumannii representa una causa importante de infecciones nosocomiales en muchos hospitales alrededor del mundo. Una gran cantidad de brotes son provocados por un una sola clona endémica. De acuerdo con las características epidemiológicas de *A. baumannii*, es capaz de persistir durante largos periodos de tiempo sobre superficies inanimadas en las proximidades de los pacientes. La contaminación ambiental es clave, ya que, el organismo puede transmitirse desde dichas superficies directamente a los pacientes o por medio de las manos de los trabajadores de la salud. Una vez que los pacientes son colonizados e infectados también representan un reservorio importante de *A. buamannii* y tienen la capacidad de transmitir este organismo a otros pacientes (Corbella X, *et al.*, 1996). De hecho, los pacientes colonizados son el principal factor de riesgo para la adquisición de la bacteria a otros pacientes en la misma unidad, mientras que el personal médico suele estar colonizado de manera transitoria. Diversos análisis moleculares demostraron que las infecciones nosocomiales causadas por este microorganismo dentro de un hospital podrían deberse tanto a clones epidémicos como esporádicos, y los factores de riesgo para la adquisición de estos clones podrían variar. (son variables), no obstante, las hospitalizaciones prolongadas siguen siendo el principal factor (D'Agata EMC, *et al.*, 2000).

Un estudio realizado en el 2008 evaluó los factores de riesgo en UCI, unidades médicas y quirúrgicas, con la finalidad de determinar si estos factores difieren entre pacientes infectados y colonizados (colonización e infección). Los autores encontraron que el uso de cefalosporinas de tercera generación, carbapenémicos y penicilinas de amplio espectro, se asociaron con un mayor riesgo tanto de colonización como de infección y como consecuencia, en la

adquisición de neumonía nosocomial provocada por cepas MDR de *A. baumannii*. Por otra parte, los pacientes encamados con previo ingreso a la UCI se vincularon con la colonización, mientras que la presencia de catéteres intravenosos y cirugías se asociaron con la infección (Tacconelli E, *et al.*, 2008).

Estudios poblacionales de *A. baumannii*.

Una característica importante de *A. baumannii* es su tendencia para causar brotes debido a su capacidad de resistencia a antibióticos y a su habilidad de sobrevivir a la desecación (Fournier P, *et al.*, 2006). Existe un número limitado de clonas específicas diseminadas en diversas áreas geográficas que son la (principal) causa predominante de brotes hospitalarios en muchos países. En los brotes institucionales las cepas de *A. baumannii* involucradas, generalmente pertenecen a una sola clona (Zowawi H, *et al.*, 2015).

Debido a que las poblaciones de *A. baumannii* son de naturaleza clonal, diversos estudios epidemiológicos (investigaron) se dieron a la tarea de investigar a los brotes nosocomiales provenientes de diversas cepas (MDR) epidémicas a nivel global, esto permitió identificar la presencia de diferentes linajes clonales reunidos en tres complejos Clonales Europeos o Clonas Internacionales (designados como I, II y III), los cuales se encuentran ampliamente diseminados en áreas geográficamente distintas. A través del análisis *Multilocus Sequence Typing* (MLST) estas clonas corresponden con las Complejos Clonales Internacionales 1, 2 y 3 (CC1, 2 y 3). La relación epidemiológica de las clonas se confirmó mediante diversos análisis como, AFLP, ribotipificación, electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE) y de manera más reciente, el previamente mencionado, MLST (Diancourt L, *et al.*, 2010; Bartual S, *et al.*, 2005). Cabe resaltar, que no se pudo establecer alguna conexión epidemiológica en tiempo o espacio entre los brotes de estas clonas en diferentes hospitales, es decir, las cepas que pertenecen a dichas clonas pueden presentarse en diferentes lugares y periodos distintos sin ningún vínculo epidemiológico evidente (Peleg, *et al.*, 2008).

Epidemiología molecular.

Para controlar la propagación de *A. baumannii* en los hospitales es necesario identificar sus dinámicas de transmisión y posibles reservorios. En orden de rastrear a la cepa causante del brote de otras cepas (que no están) de *Acinetobacter* no relacionadas epidemiológicamente, es necesario hacer una comparación de aislamientos a nivel de subespecie y los métodos con la capacidad de hacerlo se denominan métodos de tipificación epidemiológica. Una gran cantidad de sistemas de tipificación fenotípica (basados en perfiles bioquímicos, patrones de resistencia a antibióticos, serotipificación, perfil proteico y tipificación de fagos) fueron reemplazados en gran medida por sistemas de tipificación molecular. Se propusieron numerosos métodos moleculares, incluidos, (en orden histórico), el perfil de plásmidos, ribotipificación, amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD), amplificación de secuencias palindrómicas extragénicas repetitivas (Rep-PCR), análisis de huellas genómicas de alta resolución (AFLP), electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE) y finalmente, MLST (Diancourt L, *et al.*, 2010; Rafei R, *et al.*, 2014). Estos dos últimos métodos fungen en la actualidad como estándares de oro para la tipificación molecular, uno a escala local (PFGE) y el otro a escala global (MLST) (Rafei R, *et al.*, 2014).

Electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE).

En este método el ADN genómico de *A. baumannii* se digiere mediante la restricción de enzimas de corte frecuente (ApaI/SmaI) que generan grandes fragmentos de ADN, los cuales son separados dependiendo de su tamaño gracias a la migración en zigzag a través de una matriz de agarosa en respuesta a campos eléctricos que se van alternando. Los perfiles resultantes son comparados visualmente o a través de programas digitales que permiten el análisis y almacenamiento de dichos fragmentos en una base de datos. Es un sistema que actualmente sigue siendo el método preferido en muchos laboratorios y se considera como el estándar de oro, debido a su alto poder discriminatorio. Sin embargo, al igual que con otros métodos de tipificación comparativos, la reproducibilidad y comparación intrahospitalaria representan un problema (Seifert H, *et al.*, 2005).

Multilocus Sequence Typing (MLST).

Es un método de genotipificación altamente discriminatorio que se ha aplicado con éxito para la caracterización de una amplia variedad de bacterias patógenas nosocomiales, incluidas las especies de *Acinetobacter*. Es un sistema relativamente nuevo de análisis comparativo de secuencias provenientes de genes altamente conservados que permite estudiar sus relaciones epidemiológicas y estructura poblacional. Esta técnica se utiliza como un procedimiento alternativo al PFGE, fue diseñado para la vigilancia y epidemiología global. El esquema del MLST fue recientemente diseñado para *A. baumannii* por Bartual y colaboradores, está basado en la secuenciación de fragmentos internos de ADN de 305 a 513 pb de las regiones conservadas de siete genes *housekeeping*: *gltA*, *gyrB*, *gdhB*, *recA*, *cpn60*, *gpi*, y *rpoD*. Cabe resaltar que estos genes están presentes en todos los aislamientos y sus mutaciones se consideran neutrales. Las secuencias provenientes de los siete genes (fragmentos) permiten obtener un perfil alélico, el cual se compara a nivel global con otros perfiles depositados en la base de datos internacional pubMLST (<https://pubmlst.org/abaumannii/>; Bartual S, *et al.*, 2005). MLST tiene el poder suficiente para discriminar cepas dentro de *A. baumannii*, sin embargo, no se emplea para evaluar la estructura genética de esta especie.

Epidemiología global.

Los dos esquemas de MLST disponibles actualmente para *A. baumannii* fueron fundamentales para delinear la estructura poblacional de dicho microorganismo. En general, se pueden observar poblaciones relacionadas mediante el análisis de la herramienta eBURST, que utiliza las Secuencias Tipo (ST = *Sequence Type*) de *A. baumannii* obtenidas con MLST. La base de datos PubMLST bajo el esquema Oxford, asignó cepas de *A. baumannii* procedentes de distintas localizaciones geográficas a 1962 STs diferentes, que a su vez se pueden agrupar en 60 complejos clonales (CC). De manera similar, el esquema Pasteur

logró asignar cepas de *A. baumannii* a 1315 STs, distribuidas globalmente en 57 CC. (<https://pubmlst.org/abaumannii/>). Los linajes clonales internacionales I-III identificados previamente a través del análisis de AFLP se encuentran representados en ambos esquemas. En particular, existen STs agrupados como variantes de *locus* único (*single locus variants*) en ambos esquemas que pertenecen a la misma clona internacional. Es decir, el complejo CC1 dentro del esquema Pasteur es equivalente al complejo CC109 bajo el esquema Oxford y a su vez, ambos representan a la clona internacional I. Lo mismo pasa con el complejo CC2 (Pasteur) y el complejo CC92 (Oxford) en donde los dos corresponden con la clona internacional II; por último, el complejo CC3 y el complejo CC110 bajo los esquemas Pasteur y Oxford respectivamente, pertenecen a la clona internacional III (Stietz M, *et al.*, 2013).

De acuerdo con los datos previos, fue posible determinar que la estructura poblacional de *A. baumannii* está compuesta por una reducida cantidad de linajes clonales distintos que se extienden en todo el mundo. De hecho, las clonas internacionales I y II son las más prevalentes a nivel global; mientras que en países europeos la más frecuente es la clona internacional III. Toda esta información indica que ambos esquemas del MLST son prácticamente proporcionales y (son de gran utilidad) en la actualidad representan instrumentos útiles para identificar linajes clonales de cepas MDR de *A. baumannii* (Grosso F & Quinteira S, 2011; Higgins P, *et al.*, 2010).

Secuenciación del genoma completo de *A. baumannii*.

Actualmente las tecnologías de tipificación son de gran utilidad para revelar las relaciones entre aislamientos de *A. baumannii*, sin embargo, no pueden resolver diferencias entre aislamientos estrechamente relacionados provenientes de brotes a pequeña escala, en donde las cadenas de transmisión a menudo no son claras. La reciente disponibilidad de tecnologías rápidas de secuenciamiento completo del genoma y los avances de las herramientas bioinformáticas, permiten una investigación detallada de las diferencias genéticas entre aislamientos bacterianos que pertenecen a la misma especie y proporcionan una

idea de la naturaleza de las variaciones genéticas entre aislamientos que se encuentran bajo presión selectiva provocada por la presencia de antibióticos. Con respecto a *A. baumannii*, los estudios del genoma completo se han centrado hasta ahora en la comparación de distintas cepas susceptibles a los antibióticos y cepas MDR o en aislados relacionados de diferentes pacientes. Estos estudios intentaron esclarecer el papel de los elementos genéticos móviles en la transmisión de genes de resistencia a antibióticos y los posibles mecanismos relacionados con la adquisición de resistencia. Los resultados disponibles actualmente destacan el alto grado de plasticidad de su genoma, la rápida emergencia de la resistencia contra los antibióticos y las variaciones genéticas significativas entre aislamientos estrechamente relacionados (Adams M, *et al.*, 2008; Di Nocera P, *et al.*, 2011).

Hasta este momento, se encuentran disponibles en la (plataforma/banco) base de datos publica de NCBI 522 genomas completos y anotados de *A. baumannii* y cerca de 7732 están en progreso (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/403>). La primera cepa de *A. baumannii* que se secuenció fue la ATCC 17978. La comparación de este genoma con una cepa del suelo no patógena ADP1 de *A. baylyi*, permitió el reconocimiento de 28 islas alienígenas putativas (pAs) presentes en la cepa ATCC 17978, definidas como regiones genómicas mayores a 10 kb de tamaño, que posiblemente se adquirieron mediante transferencia horizontal genética. Doce de estas pAs poseen genes que comparten una identidad relevante con genes involucrados en el desarrollo de la patogénesis; como genes vinculados a factores de virulencia; con genes implicados en la resistencia a los antibióticos, con resistencia a metales pesados, con la motilidad, con la secreción de proteínas, la percepción del quórum y la absorción de hierro. En resumen, una gran cantidad de los genes de resistencia a antibióticos y factores de virulencia que se encontraron en el genoma de la cepa ATCC 17978 residen en estas islas, por lo que juegan un papel importante en la patogénesis de este organismo (Smith, M. *et al.*, 2007).

En el año 2008, se secuenciaron cinco cepas más de *A. baumannii*, tres representaron al CC1 (AYE, AB0057 y AB307-0294), una al CC2 (ACICU) y, por último, una cepa (SDF) completamente susceptible a antibióticos aislada de un piojo. Mediante la comparación de genomas de las cepas AYE, SDF y la no patógena ADP1, fue posible identificar una gran cantidad de funciones que podrían explicar la adaptación a diversos nichos ecológicos. En particular, se detectó una Isla de Resistencia (AbaR) de 86 kb, exclusivamente en el aislamiento MDR AYE, la cual albergó varios elementos genéticos móviles y genes relacionados con la resistencia de metales pesados y a antibióticos, sugiriendo que la presencia de esta AbaR contribuye con el fenotipo MDR de la cepa y, por lo tanto, en la capacidad de *A. baumannii* para propagarse en entorno hospitalario. Un gran número de variantes de AbaRs se han descrito hasta ahora que difieren principalmente en el número y la naturaleza de los genes de resistencia y de los elementos genéticos móviles que contienen. Esto indica que *A. baumannii* es propensa a acumular genes de resistencia en regiones genéticas específicas. Notablemente, no se identificó ninguna AbaR en el genoma de ATCC 17978, debido a que esta cepa se aisló antes del desarrollo de los antibióticos de nueva generación (Adams M, *et al.*, 2008; Fournier P, *et al.*, 2006; Vallenet D, *et al.*, 2008; Iacono M, *et al.*, 2008).

Hornsey M y colaboradores en el año 2011 analizaron dos aislamientos de *A. baumannii* pertenecientes al mismo linaje epidémico, colectados con una semana de diferencia en el mismo paciente, con el objetivo de dilucidar la naturaleza y el alcance de la plasticidad genómica de este microorganismo en el transcurso de una infección corta. El primer aislamiento se recuperó antes de que el paciente se sometiera a un tratamiento con tigeciclina, contra el cual la cepa fue susceptible, mientras que el segundo aislado se recuperó postratamiento y mostró resistencia al antibiótico. Este último aislamiento exhibió concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) considerablemente reducidas para los aminoglucósidos. El análisis del genoma demostró diferencias significativas, como 18 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) y tres deleciones de 15, 44 y 17 kb entre los aislamientos de *A. baumannii* antes y después de la terapia con el antibiótico. Este estudio proporcionó información importante sobre las alteraciones genéticas que se producen bajo presión selectiva en presencia de

antibióticos, destacó la importancia de los SNPs en aislamientos estrechamente relacionados y la adquisición de elementos genéticos móviles en la evolución de *A. baumannii* (Hornsey M, *et al.*, 2011).

Los análisis genómicos comparativos en cepas clínicas de *A. baumannii* resaltaron las diferencias en la organización genómica de clonas epidémicas asignadas a diferentes genotipos por PFGE o tipos de secuencia (STs), definiendo grupos de genes que pertenecen al genoma “core” o “accesorio” en *A. baumannii*. La tecnología de secuenciamiento completo del genoma en cepas MDR de *A. baumannii* también se ha utilizado para analizar la estructura y la composición genética de diversos tipos de AbaRs y de un gran número de plásmidos que portan determinantes genéticos de resistencia a antibióticos (Di Nocera P, *et al.*, 2011).

Características generales del genoma de *A. baumannii*.

El pan-genoma de una especie en particular representa a todo su repertorio genético y corresponde a la suma total de los genomas “core” y “accesorio”. El genoma *core* se compone de sets de genes que están presentes en todas las cepas de ciertas especies, mientras que el genoma accesorio incluye genes que se encuentran ausentes en al menos una cepa, por lo tanto, son aquellos genes cuyas funciones no son primordiales para el crecimiento y el desarrollo del organismo, pero le confieren ciertas ventajas selectivas, como adaptación a ciertos nichos en particular, resistencia a algunos tipos de estrés y patogenicidad (Medini D, *et al.*, 2005).

La mayor parte del genoma core en cepas clínicas de *A. baumannii* es responsable del metabolismo y de los procesos celulares generales, mientras que una pequeña fracción codifica para proteínas hipotéticas de las cuales su función es desconocida. Otras funciones relevantes codificadas por genes core son, adhesión, movilidad, detección célula-célula, metabolismo del hierro y resistencia a antibióticos. Los mecanismos de resistencia a antibióticos incluyen varias enzimas modificadoras y sistemas de eflujo involucrados en la extrusión

de metales pesados. Este repertorio genético se encuentra implicado en el nivel intrínseco de resistencia para fármacos en *A. baumannii* (Adams M, *et al.*, 2008).

De acuerdo con estudios previos, el genoma core de *A. baumannii* puede variar entre 1455 y 2688 CDSs (secuencias ortólogas codificantes), dependiendo del número e identidad de las cepas analizadas (Peleg A, *et al.*, 2012; Adams M, *et al.*, 2008). Un estudio en 2011 realizó predicciones teóricas acerca del tamaño del genoma core en poblaciones de cepas clínicas (de 12 genomas disponibles en ese momento), mediante el desarrollo de gráficos con un número infinito de genomas, puntualizaron un genoma core entre el 40% y 65% del contenido promedio del genoma (Imperi F, *et al.*, 2011).

En contraste, el pan-genoma de *A. baumannii* es impresionantemente largo, debido a que se incrementa exponencialmente en tamaño a medida que nuevas secuencias de genomas se encuentren disponibles, lo que resalta la importancia de eventos de pérdida y ganancia genética en la adaptación y evolución de este patógeno. Es importante enfatizar que *A. baumannii* se encuentra *dotado* de un pan-genoma abierto, propenso a adquirir fácilmente nuevas funciones. La gran contribución del pan-genoma a las especies esta proporcionada por genes que no están compartidos en todas las cepas (genes accesorios), de los cuales el 25-46% son únicos para cada cepa. Comparado con el genoma core, el accesorio está enriquecido por estructuras adquiridas de manera horizontal como los elementos genéticos móviles (Adams M, *et al.*, 2008; Imperi F, *et al.*, 2011).

Elementos genéticos móviles asociados a la resistencia de antibióticos en *A. baumannii*.

La excesiva plasticidad genética presente en (los genomas) de *A. baumannii* le ha permitido acumular y diseminar una gran variedad de elementos genéticos móviles relacionados con genes de resistencia, lo que ha contribuido en gran medida a la alta incidencia de cepas MDR en hospitales alrededor del mundo.

Islas genómicas de resistencia (AbaRs).

Las islas genómicas que contienen marcadores de resistencia a antibióticos se conocen como islas de resistencia. Estas islas se describieron en primer lugar en proteobacterias, como *S. enterica*, *S. flexneri*, *S. aureus*, *V. cholerae*, y finalmente en *A. baumannii* (Schmidt H, & Hensel M, 2004; Fournier P, *et al.*, 2006). Los aislamientos clínicos de *A. baumannii* albergan grandes sets de genes transferidos horizontalmente que confieren resistencia a múltiples antibióticos y metales pesados, dichos genes se encuentran integrados en un sitio específico, particularmente en el gen ATPasa (Post V, *et al.*, 2010).

Como se mencionó antes, Fournier y colaboradores describieron por primera vez una isla de resistencia tipo AbaR1 en *A. baumannii*. Esta Isla es una región que se incorpora e interrumpe a un gen ATPasa, creando un sitio de duplicación de 5 pb (ACCGC). El backbone de una AbaR se compone de cinco marcos de lectura abiertos (ORFs), *orf1*, *orf2*, *orf3*, *tniA* y *tniB*, los cuales constituyen el módulo de transposición y otros dos genes *uspA* que codifican para proteínas de estrés universal y una permeasa de sulfato (*sul*) (Fournier P, *et al.*, 2006; Seputiene V, *et al.*, 2012).

Actualmente se ha descrito una extensa variedad de AbaRs en *A. baumannii*. Dichas islas se han identificado en cepas epidémicas de *A. baumannii* pertenecientes a los complejos clonales internacionales I y II (o bien, al CC1 y CC2). La mayoría de estas estructuras están presentes en cepas que pertenecen al CC1, de las cuales AbaR1, AbaR2 y AbaR3, son las más representativas. Estas AbaRs comparten el backbone del transposón *Tn6019* de 16.3 kb, que se encuentra interrumpido por un gran transposón compuesto, el cual contiene una región variable de resistencia flanqueada por copias del *Tn6018* (Post V, *et al.*, 2010; Krizova L, *et al.*, 2011).

AbaR1 es la isla de resistencia más grande descrita hasta la fecha. Esta isla presenta un tamaño de 86 kb y originalmente fue descrita en la cepa de *A. baumannii* AYE, que corresponde al CC1. Dicha cepa fue responsable de brotes importantes en hospitales de Francia durante el 2004. El análisis del genoma de la cepa exhibió la presencia de un gran conjunto de genes, entre ellos, muchos determinantes de resistencia insertados en la AbarR en el cromosoma (Fournier P, *et al.*, 2006).

AbaR2 fue descrita en la cepa epidémica MDR de *A. baumannii* ACICU, la cual pertenece al CC2 (y curiosamente porta un plásmido que a su vez alberga dos copias del gen *blaOXA-58*.) Las cepas de *A. baumannii* AYE y ACICU corresponden a diferentes complejos clonales (CC1 y CC2, respectivamente), sin embargo, la presencia de islas de resistencia relacionadas en ambos linajes sugiere que AbaR1 y AbaR2 derivaron de una isla adquirida por un ancestro común antes de su divergencia en dos linajes clonales diferentes (Iacono M, *et al.*, 2008).

El aislamiento AB0057, alberga a la isla AbaR3 integrada en el gen *comM*. Esta isla genómica de resistencia parece ser el ancestro de diversos tipos de AbaRs los cuales derivaron de ella por la pérdida de segmentos de diferentes longitudes que incluyen uno o más de los genes de resistencia. AbaR3 contiene ocho genes asociados a la resistencia a antibióticos (Krizoba L & Nemeč A, 2010). El backbone del transposón de esta isla se encuentra estrechamente relacionado a un transposón, recientemente nombrado *Tn6021* que interrumpe al gen *comM*. Este aislamiento incluye una segunda isla, llamada AbaR4, la cual porta solo un gen de resistencia a carbapenémicos *blaOXA-23*. AbaR4 difiere de *Tn6021* solo en que carece de una secuencia de inserción en el *orf1*, incluye un pequeño parche de 90.8 % de identidad en la región del gen *orf1-tniA*, y contiene un transposón *Tn2006* que porta al gen *blaOXA-23* insertado justo dentro del extremo 5' del gen *sup* (codifica para una sulfato permeasa). El backbone de AbaR4 se designó como *Tn6022* (Hamidian M & Hall R, 2011).

Elementos transponibles.

Los elementos transponibles son secuencias móviles de ADN que tienen la habilidad de moverse a través del genoma bacteriano y cambiar su ubicación dentro de este, son cruciales para la diversificación y adaptación biológica. Estos elementos son capaces de generar reordenamientos en el ADN de la bacteria y causar modificaciones en la expresión genética. En *A. baumannii* las secuencias de inserción (IS) y transposones (Tn) son segmentos móviles discretos asociados con/a la expresión y propagación de los genes de resistencia (Muñoz L & García P, 2010).

Secuencias de inserción (IS).

Las secuencias de inserción bacterianas generalmente representan a los elementos móviles más abundantes y más pequeños, su tamaño varía entre los 2.5 kb y 0.7 kb. Estos elementos contribuyen en gran medida en la variación genómica y fenotípica de un gran número de especies bacterianas. Tienen un papel importante en la diseminación de genes de resistencia (Wright MS, et al., 2017).

Además de su papel de transposición, se ha demostrado que algunas IS activan o incrementan la expresión de genes adyacentes. Esta capacidad se debe a la presencia de regiones promotoras propias de la secuencia de inserción o por la formación de nuevos promotores después de un evento de inserción (Mahillon J & Chandler M, 1998).

Las secuencias de inserción presentes en los genomas de *A. baumannii* intervienen en la movilización y expresión de las β -lactamasas tipo OXA. Esto es particularmente evidente debido a que estos elementos se han identificado con frecuencia asociados a los genes OXA (Evans B & Sebastian G, 2014).

La secuencia ISAb1 es la más prevalente en *A. baumannii* y se describió por primera vez en el año 2001. Este elemento pertenece a la familia IS4 y presenta

secuencias repetidas invertidas (IRs) de 11 pb, rodeadas de repeticiones directas cortas de 9 pb de la secuencia diana. Aun cuando esta secuencia es exclusiva de dicho organismo, también se ha identificado en cepas de *A. Iwoffii*, resaltando la gran capacidad de movilidad de esos elementos, lo que deja en evidencia que los eventos de trasposición de ISAb1 suceden con frecuencia (Segal H, *et al.*, 2005).

ISAb1 se localiza regularmente en asociación con un gran número de genes tipo OXA, como *blaOXA-23*, *blaOXA-51*, *blaOXA-58* y *blaOXA-235*. La posición de ISAb1 a 25 pb río arriba de *blaOXA-23*, proporciona una secuencia promotora que conduce a la transcripción del gen. De manera similar ocurre cuando esta secuencia se localiza 7 pb río arriba del gen *blaOXA-51*, lo que promueve un incremento en los niveles de expresión de hasta 50 veces. Es decir, cuando dicho elemento se ubica río arriba de estos genes, tiende a incrementar su expresión a niveles que generan resistencia a carbapenémicos, esto se ve reflejado en los elevados niveles de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) que presentan las cepas que albergan a las secuencias tipo ISAb1. (Figueiredo S, *et al.*, 2009; Evans BA, *et al.*, 2013).

Cabe resaltar que adicionalmente de su función en la sobreexpresión los (de este tipo de) genes tipo OXA, las secuencias ISAb1 también son las responsables de su movilización. La identificación de ISAb1 dentro de un gran número de transposones portadores de genes *blaOXA* y otros determinantes de resistencia, así como su amplia diseminación en un gran número de especies bacterianas, subrayan la importancia de estos elementos en la plasticidad genómica de la *A. baumannii* (Corvec S, *et al.*, 2007).

La secuencia de inserción ISAb3 frecuentemente está asociada con el gen *blaOXA-58*, a menudo con una copia río arriba y otra río abajo, formando un transposón compuesto. Este elemento se identificó por primera vez en *A. baumannii* en el año 2003 (Poirel L, *et al.*, 2005; Leski TA, *et al.*, 2013). Cuando ISAb3 se localiza río arriba en orientación opuesta al gen, proporciona un

promotor que impulsa la sobreexpresión de *blaOXA-58*, de manera similar como ocurre con ISAba1. La falta de sitios de duplicación ya sea río arriba o debajo de la secuencia sugiere que este elemento está involucrado en la diseminación de genes a través de un proceso de recombinación homóloga en lugar de transposición. En muchos casos ISAba3 se encuentra interrumpido por otras secuencias de inserción como IS1008, ISAba2, ISAba825 e IS18, en dichas instancias estos elementos quiméricos contienen promotores híbridos que potencian la sobreexpresión a diferentes niveles de los genes *blaOXA-58* (Poirel L & Nordmann P. 2006; Ravasi P, *et al.*, 2011).

Mientras que los elementos ISAba1 e ISAba3 son los elementos comúnmente asociados a genes *blaOXA* en *A. baumannii*, existen otras secuencias como, ISAba125 e IS26 que se unen al gen *blaOXA-58*; la inserción de ISAba4 se ha encontrado a 25 pb río arriba del gen *blaOXA-23*, así mismo las secuencias ISAba9 e ISAba10 se encuentran asociadas a los genes *blaOXA-51* y *blaOXA-23*, respectivamente. Ambos elementos forman quimeras con ISAba1 e incrementan la expresión de cada gen (Figueiredo S, *et al.*, 2009; Lee Y, *et al.*, 2011).

Actualmente en la base de datos pública ISfinder se encuentran depositadas aproximadamente 4600 secuencias de inserción (ISs) diferentes, agrupadas en 29 familias o grupos, provenientes de bacterias y arqueas. Dicha plataforma permite identificar diversos fragmentos IS presentes en numerosos genomas, también contribuye a comprender sus efectos en los genomas hospederos, así como sus posibles mecanismos de regulación y transposición. Además, ISfinder sirve como repositorio de ISs, en donde cada secuencia nueva es indexada junto con información como, su secuencia de ADN, ORFs, o posibles secuencias codificantes, sitios blanco, su origen, distribución y designación de la familia y número de acceso (Siguier P, *et al.*, 2006).

Transposones.

Los transposones son unidades más grandes y complejas que las secuencias de inserción, su tamaño varía de 3 kb hasta 40 kb. Se encuentran flanqueados por repeticiones invertidas (IR), incluyen un gen de transposasa y pueden albergar una gran cantidad de genes que codifican para resistencia a antibióticos (Partridge S, *et al.*, 2018).

En *A. baumannii* los transposones Tn2006, Tn2007, Tn2008, Tn2008B y Tn2009 son estructuras que portan genes de resistencia a carbapenémicos como *blaOXA-23*. El transposón más frecuente es Tn2006 (40.8%), seguido de Tn2009 (23.7%), Tn2008 (18.6%), Tn2008B (0.5%) y finalmente Tn2007 (0.4%) (Corvec S, *et al.*, 2007; Mugnier P, *et al.*, 2010; Hamidian M & Nigro S, 2019). Un gran número de estudios indicaron que el elemento Tn2006 que incluye al gen *blaOXA-23* representa al componente más común de la resistencia contra carbapenémicos y al mismo tiempo se asocia con una amplia diseminación entre diferentes cepas de *A. baumannii*. En este transposón, el gen *blaOXA-23* está rodeado por dos copias de ISAb1 localizadas en direcciones opuestas. El elemento Tn2008 es semejante al Tn2006 sin embargo, presenta una sola copia de la secuencia ISAb1 adyacente al gen de resistencia. En Tn2007 el gen está asociado únicamente a un elemento ISAb4 localizado río arriba. El transposón Tn2009 a menudo aparece en cepas que pertenecen a la clona intencional II, algunos de estos aislamientos exhiben múltiples copias en el cromosoma de manera simultánea, por tal motivo, es de los transposones más frecuentes (Mugnier P, *et al.*, 2010; Hamidian M & Nigro S, 2019).

Integrones.

Son plataformas de ensamblaje y expresión de elementos genéticos, no son automovilizables (si no que dependen de otros elementos como plásmidos y una amplia variedad de transposones, para diseminarse) y pueden estar contenidos en cromosoma, plásmidos y en una amplia variedad de transposones. Estas estructuras poseen un sitio conservado de integración (o sitio de recombinación) (*attI*), un gen de la integrasa (*intI*), un promotor (*Pc*) y casetes genéticos móviles. Estos elementos suelen estar divididos en tres secciones principales: la región 5' conservada, la región variable y la región 3' conservada. El segmento 5'

contiene al promotor (*Pc*) y el gen *int*, la región variable siempre incluye una gran colección de casetes genéticos de resistencia a antibióticos y, por último, el extremo 3' consiste de secuencias derivadas de transposones como genes *qacEΔ*, *sul1* y *orf5*, que codifican para la resistencia a desinfectantes, antisépticos y sulfonamidas (Partridge S, *et al.*, 2018; Betteridge T, *et al.*, 2011).

Los integrones de clase 1 (*int1*) son los componentes más prevalentes (99.7%) en aislamientos clínicos de *A. baumannii*, principalmente en Norte América, Asia y Europa, mientras que los integrones de clase 2 (*int2*) son los menos frecuentes (0.3%) (Lee Y, *et al.*, 2009; Japoni-Nejad A, *et al.*, 2013). Estudios realizados en América Latina reportaron una extensa distribución de integrones de clase 2 en aislamientos clínicos de *A. baumannii* (Martins D, *et al.*, 2015; Pagano M, *et al.*, 2013; Fonseca E, *et al.*, 2011).

Los integrones de clase 1 presentes en los genomas de *A. baumannii* típicamente coleccionan una vasta diversidad de genes en forma de casetes genéticos, que codifican para la resistencia a aminoglucósidos (*aacA7*, *aac(6')*, *aadA1*, *aacA4*), trimetoprima (*dhfr1*), carbapenémicos (*blaOXA*, *blaVIM*, *blaIMP*), desinfectantes (*qacEΔ*) y sulfonamidas (*sul1*), por mencionar algunos. De modo que, dichas estructuras constituyen vehículos importantes para la transferencia horizontal de esta variedad de genes de resistencia y en conjunto contribuyen con el fenotipo de multiresistencia. Cabe resaltar que también se vinculan con diferentes secuencias de inserción como IS6100, IS2000, IS1999 e IS26, lo que promueve aún más su propagación (Partridge S, *et al.*, 2018; Mendes R, *et al.*, 2007; Fluit A & Schmitz F, 2004).

Martin D y colaboradores realizaron un análisis en el año 2015 para determinar la relación de integrones de clase *int1* y *int2* con linajes clonales de *A. baumannii*. Los autores identificaron que los integrones de clase 1 se asocian estrechamente con el CC109/1 (CC1), mientras que los integrones de clase 2 con el CC113/79. Concluyeron que los integrones de clase *int2*, predominan en América latina, debido a esto se podría explicar la alta prevalencia del CC113/79

en esa región, en el mismo estudio, se detectó una prevalencia similar en *A. nosocomialis*. Concluyeron que la alta prevalencia del CC113/79 en América latina se debe a que los int2 predominante en esa región (Martins D, *et al.*, 2015).

Plásmidos.

Son elementos genéticos extracromosómicos que tienen la función de ser vectores importantes para el transporte de otros elementos genéticos móviles y genes de resistencia a antibióticos, se encuentran presentes en una gran cantidad de bacterias Gram negativas y Gram positivas. Juegan un papel muy importante en la evolución de las bacterias MDR debido a su capacidad de diseminar genes de resistencia entre los patógenos clínicos de mayor preocupación en el sector médico (Snyder L & Champness W, 2007).

La presencia extracromosomal de estas estructuras se debe a la capacidad para replicarse de manera autónoma e independiente de la célula huésped (del cromosoma), así mismo, tienen la habilidad de transferirse entre bacterias mediante funciones de conjugación y/o movilización, lo que les permite propagarse eficientemente de manera horizontal, la cual es reconocida como la mayor fuerza impulsora en la adaptación y diversificación bacteriana (Partridge SR, *et al.* 2018).

El backbone de dichos elementos está constituido por un abundante repertorio de genes involucrados en procesos como, replicación, partición, restricción-modificación, movilidad y conjugación, en conjunto, este set de genes con funciones de mantenimiento forma el genoma core del plásmido y además se pueden agregar otras regiones genéticas accesorias (transposones, IS, integrones y genes de resistencia) con funciones adaptativas que le otorgan ciertas ventajas selectivas que benefician tanto al plásmido como a la célula huésped en presencia de diversas condiciones. Los plásmidos con backbone estrechamente relacionados podrían presentar un cargo (genes de resistencia y

otros elementos genéticos móviles) diferente en su región accesoria y, por el contrario, plásmidos con backbone diferentes podrían albergar el mismo cargo en dicha región (Thomas C, 2000; Partridge SR, *et al.* 2018).

En *A. baumannii* los plásmidos presentan una extensa variedad de tamaños, pueden medir desde 2 kb los más pequeños y alcanzar tamaños superiores a las 100 kb. Con frecuencia los plásmidos grandes son el objeto de diversos análisis debido a que albergan un gran número de determinantes de resistencia y a su naturaleza auto-transmisibles (conjugativos), mientras que los plásmidos pequeños se destacan principalmente solo aquellos que contienen genes de resistencia a antibióticos (Hamidian M, & Hall R. 2014; Hamidian M, *et al.*, 2012; Hamidian M, *et al.*, 2014; Grosso F, *et al.*, 2012). Cada plásmido tiene un número de copias que puede variar entre plásmidos y células bacterianas. Por lo tanto, una célula puede albergar dos tipos diferentes de plásmidos; los de gran tamaño (grandes) que presentan un bajo número de copias (1-5) y los de menor tamaño que suelen ser de alto número de copias (>20) (Snyder L & Champness W, 2007).

Los plásmidos en *A. baumannii* juegan un papel crucial en la propagación de genes de resistencia a antibióticos y en la evolución de este patógeno nosocomial. Por ejemplo, los plásmidos conjugativos grandes (entre 80 y 130 kb) están implicados en la propagación del gen *blaOXA-23* en cepas que pertenecen a los complejos clonales CC1 y 2, así como en cepas que no pertenecen a estas clonas. Por otra parte, numerosos estudios han demostrado que los genes de resistencia *blaOXA-23*, *blaOXA-58*, *blaOXA-24*, *blaNDM-1*, *blaGES-11*, *blaVIM* y *blaIMP* que codifican para una amplia gama de antibióticos se encuentran incluidos en plásmidos de cepas MDR (Hamidian, *et al.*, 2016; Da Silva G, Domingues S, 2016; Lee, M, *et al.*, 2013b). Otros análisis identificaron que elementos genéticos adicionales, como integrones de clase 1 asociados a genes de resistencia contra carbapenémicos en *A. baumannii* también están localizados en estos replicones (Liu S, *et al.*, 2006). Adicionalmente, los transposones Tn2009, Tn2008, Tn2007 y Tn2006 relacionados con la estructura *blaOXA-23* se reportaron de igual modo en plásmidos de cepas MDR de este

microorganismo (Corvec S, et al., 2007; Mugnier P, et al., 2010). Recientemente un estudio realizó el análisis de una cepa de *A. baumannii* proveniente de Asia, dicha investigación reveló la cepa contiene a los genes *blaNDM1* y *blaOXA-58* insertos en un transposón Tn125. El gen *blaNDM1* se identificó flanqueado por la secuencia ISAb125, mientras que el gen *blaOXA-58* se detectó rodeado por las secuencias de inserción ISAb11 e ISAb3. Ambos genes de resistencia estuvieron alojados en los plásmidos de este aislamiento asiático (Alatraqchi A, et al., 2021).

Inicio de la replicación y control de número de copias.

Como ya se mencionó previamente los plásmidos son elementos genéticos extracromosómicos que se mantienen y dependen de los recursos de la célula huésped. Para que no se pierdan deben asegurar que su tasa de replicación esté coordinada con la tasa de crecimiento celular, a través de un fino control de la replicación y segregación de dichas estructuras (Snyder L & Champness W, 2007).

La replicación de estas estructuras inicia en la región de origen (*ori*), (cuya secuencia) que es una de las secuencias más importantes dentro del DNA plasmídico y asegura una replicación autónoma e independiente de la replicación del cromosoma bacteriano. Comúnmente esta región se activa mediante la unión de una proteína de iniciación (Rep) codificada por el gen *rep* del plásmido que se encuentra adyacente a unas secuencias directamente repetidas cortas llamadas iterones, los cuales tienen un papel crucial durante la iniciación de la replicación y en el control de número de copias (Partridge SR, et al. 2018).

El sitio de origen de replicación (*ori*) y los sitios de unión de la proteína Rep típicamente forman los componentes básicos de todos los plásmidos, denominado, el replicón básico, que es la fracción más pequeña de ADN (1-5 kb). El origen de replicación contiene una región abundante de A (adenina) y T (timina) con un tamaño aproximado entre 40 pb y 100 pb, representa a la estructura más conservada en replicones eucariontes y procariontes. En esta

región se genera el elemento de desenrollamiento del ADN en donde se genera el complejo de replicación y la síntesis del ADN da inicio (Konieczny I, 2003). Este contenido rico en A+T proporciona una región de baja estabilidad termodinámica y contribuye a la separación de la doble hélice. La apertura de la doble hélice se induce cuando la proteína Rep (interacciona directamente con los iterones) se une a los iterones, y como ya se indicó antes, se encuentran localizados próximos al origen de replicación. Los plásmidos codifican su propia maquinaria de inicio de la replicación, sin embargo, utilizan la maquinaria de replicación codificada cromosomalmente (polimerasa, primasa, helicasa, etc.) para su propia síntesis de ADN (Partridge SR, *et al.* 2018; Snyder L & Champness W, 2007).

Los plásmidos que contienen iterones han desarrollado una serie de estrategias para garantizar su estabilidad hereditaria y mantenimiento en el número de copias específico. Estos plásmidos se producen en un bajo número de copias por célula bacteriana, por lo que su mantenimiento requiere de una estricta regulación de la replicación. Los principales elementos implicados en la regulación de este proceso en los plásmidos son los iterones. Los mecanismos de control de copias varían ampliamente entre diferentes tipos de plásmidos sin embargo existen dos que detallan las estrategias básicas (Konieczny I, *et al.*, 2014)

El "*handcuffing*" es un mecanismo de inhibición de la replicación observado en los plásmidos que contienen iterones. La formación de la estructura de este sistema se basa en la habilidad de la proteína iniciadora (Rep) de acoplarse en dos regiones *ori* localizadas en moléculas separadas del plásmido a la vez. El acoplamiento del *ori* ocurre mediante la unión de la proteína Rep a los iterones. Cuando la concentración de proteína iniciadora es elevada, ocurre un múltiple emparejamiento de iterones lo que provoca un impedimento estérico en su función y previene una nueva ronda de iniciación de la replicación al inhibir la fusión al origen (Partridge SR, *et al.* 2018).

Las elevadas concentraciones de la proteína Rep dan lugar a eventos de inicio de la replicación más frecuentes y descontrolados. Para evitar eso, existe un mecanismo de control que limita la cantidad de esta proteína Rep en la célula. La autorepresión transcripcional es el mecanismo que permite equilibrar los niveles del gen dentro de los límites. La autorepresión está mediada por la unión de dímeros de Rep a secuencias invertidas repetidas (IR) ubicadas adyacentes a la región *ori*. Este tipo de mecanismo de regulación inhibe el inicio de la transcripción del promotor de gen y, por lo tanto, reduce la síntesis del iniciador. La proteína Rep tiene la capacidad de activar el inicio de la replicación cuando presenta niveles basales, y actúa como inhibidor cuando sus niveles son altos (Del Solar G, *et al.*, 1998; Snyder L & Champness W, 2007).

Replicación tipo *theta*.

Este tipo de replicación generalmente lo presentan los plásmidos de bacterias Gram negativas, especialmente las proteobacterias (Snyder & Snyder, 2013). Dicho mecanismo necesita de la interacción de dos componentes claves, el sitio de origen de la replicación *ori* y el gen *rep* que codifica para la proteína iniciadora Rep (en conjunto con los elementos de su zona operadora). Cabe resaltar que los plásmidos que contienen iterones y un *ori* con una región rica en bases A+T presentan este mecanismo de replicación (Del Solar G, *et al.*, 1998).

En este sistema de replicación para que de inicio la síntesis de ADN, se requiere de la proteína DnaA proporcionada por el hospedero y las proteínas Rep producidas por el plásmido. La formación del complejo nucleoproteico de preiniciación se lleva a cabo mediante la unión de la proteína Rep con los iterones. El complejo además incorpora elementos propios de la célula hospedera como, la primasa, la ADN polimerasa III y a las helicasas DnaA, B y C. Una vez que las proteínas DnaA y Rep se conectan con la región enriquecida con las bases A+T en el *ori*, se inicia la replicación. En este punto se origina la apertura de las dos hebras del ADN con la ayuda del complejo de helicasas DnaB y C que favorecen el desenrollamiento. Posteriormente la primasa sintetiza un pRNA (iniciador) el cual se elonga de manera covalente por la ADNpol III hasta

obtener la replicación completa de las dos cadenas (Del Solar G, *et al.*, 1998; Filutowicz M, *et al.*, 1994; Bramhill D & Kornberg A, 1988).

La síntesis de ADN es continua en la cadena principal y discontinua en la cadena retrasada, sin embargo, la síntesis de ambas hebras es acoplada. Este tipo de síntesis puede partir de uno o más orígenes y la replicación podría preceder en una sola dirección (unidireccional) o en ambas direcciones (bidireccional) (Del Solar G, *et al.*, 1998).

Sistemas de partición.

Los sistemas de partición garantizan el mantenimiento estable de plásmidos con bajo número de copias en bacterias, son procesos impulsados activamente responsables de asegurar la distribución regular de copias del plásmido en las células hijas. Estos sistemas se encuentran ampliamente distribuidos en el mundo bacteriano y están codificados tanto a nivel cromosomal como plasmídico. El sistema de partición es el determinante más importante de la estabilidad de plásmidos de bajo número de copias. En contraste, los plásmidos con alto número de copias generalmente no codifican este tipo de sistemas, debido a que su segregación aleatoria es suficiente para mantener su estabilidad (Gerdes K, *et al.*, 2000).

Este sistema de segregación es un mecanismo dinámico, los plásmidos se ordenan y se desplazan dentro de la célula para que la división celular asegure al menos una copia en cada célula hija en cada ciclo celular. Existe una amplia diversidad entre los sistemas de partición presentes en plásmidos, no obstante, sus componentes y organización genética son altamente conservados. Los sistemas consisten típicamente de un módulo de partición compuesto por tres elementos: un sitio que consta de una serie de secuencias repetidas denominado *parS*, es un sitio similar al centrómero que actúan en *cis* y dirigen la acción de la maquinaria de segregación; los dos elementos restantes forman un complejo proteico y están codificados por los genes, *ParA* que codifica para una ATPasa; y *ParB* que codifica una proteína de unión en un sitio específico del ADN o

proteína de unión al centrómero. Ambas proteínas se encuentran codificadas por un operón cuya transcripción es autorregulada (Bignell C. & Thomas C, 2001).

En general ambas proteínas se unen al sitio *parS* y forman un complejo nucleoproteico. El primer evento que pone en marcha la segregación es el ensamblaje de la proteína ParB sobre el sitio *parS* para formar el complejo de partición en cada copia de plásmido. Este complejo se extiende mediante la adición de varias moléculas ParB que se unen y esparcen en el ADN. La ATPasa (ParA) reconoce al plásmido al colaborar específicamente con ParB, dicha interacción estimula la formación de ensamblajes mediados por ParA, que empujan y arrastran réplicas de plásmidos hacia cada polo de las dos mitades de las células (Gerdes K, *et al.*, 2000).

Las secuencias de los plásmidos p3ABAYE, pACICU1 y 2 presentes en genomas de *A. baumannii* (AYE y ACICU) permitieron determinar la presencia de los componentes ParA y ParB involucrados en el sistema de partición (Bertini, *et al.*, 2010).

Sistemas toxina-antitoxina (TA).

Estos sistemas se encuentran codificados tanto en plásmidos como en cromosomas de bacterias y son piezas clave en la adaptación al estrés. Originalmente los módulos TA se detectaron en la década de 1980s en dos plásmidos de *E. coli*, organizados como casetes genéticos y compuestos por un par de genes involucrados en el mantenimiento y estabilidad de dichos plásmidos. Aseguran la herencia vertical del replicón debido a que suprimen el crecimiento de aquellas células que han perdido el plásmido en cada división celular (Songwei Ni, *et al.*, 2021).

Los sistemas están compuestos por la co-expresión de dos genes, uno que codifica para una toxina y su contraparte, la antitoxina. Las toxinas de todos los

sistemas TA caracterizados son proteínas, mientras que las antitoxinas son proteínas o RNA pequeños (RNAs) no codificantes. La toxina es más estable que la antitoxina, la cual es degradada rápidamente por proteasas de la familia Clp o Lon, sin embargo, se expresa en niveles más altos. Generalmente los sistemas TA están clasificados en 7 categorías diferentes, no obstante, el más estudiado y abundante entre los plásmidos y genomas bacterianos es el sistema tipo II, en donde ambos genes están organizados en un operón. En este mecanismo la antitoxina forma un complejo estrecho con su respectiva toxina y bloquea sus funciones de muerte celular o inhibición de crecimiento bacteriano, todo esto ocurre mientras el plásmido está contenido en la célula. Por otra parte, una vez que el plásmido se pierde las proteasas degradan rápidamente a la antitoxina y las funciones de la toxina se reestablecen, provocando la muerte celular. Típicamente la expresión del operón TA es autoregulado solo por la antitoxina, o bien por el complejo TA en el promotor (Song S & Wood TK. 2020; Unterholzner SJ, *et al.*, 2013; Songwei Ni, *et al.*, 2021).

Jurénaité y colaboradores en el año 2013 llevaron a cabo una búsqueda bioinformática meticulosa para identificar sistemas TA en genomas de cepas de *A. baumannii*, detectaron 15 posibles pares de genes que codifican para el sistema, de los cuales solo 5 mostraron ser funcionales. De estos, tres sistemas RelB/RelE, HicA/HicB y HigB/HigA fueron homólogos de otras bacterias y arqueas, mientras que los dos restantes SpIT/SpIA y CheT/CheA fueron únicos. Cabe destacar que los pares de módulos SpIT/SpIA y HigB/HigA representaron a los sistemas más prevalentes albergados en plásmidos de aislamientos clínicos de *A. baumannii* pertenecientes al CC2 (Jurénaité M, *et al.*, 2013).

Sistema de Restricción-Modificación.

Los sistemas de restricción-modificación (R-M) están ampliamente extendidos en las bacterias; en el contexto de protección del ADN constituyen un mecanismo de defensa xenofóbico, ya que protegen al ADN residente contra la contaminación de secuencias de origen externo. Sin embargo, su presencia no es imprescindible, ya que algunas cepas carecen de este mecanismo. El sistema R-M está compuesto por dos actividades enzimáticas contrastantes: una

endonucleasa de restricción (REasa) y una metiltransferasa (MTasa). La REasa reconoce y escinde secuencias de ADN extrañas en sitios específicos, y genera extremos 5' o 3' cohesivos o romos; mientras que la actividad de la MTasa asegura la discriminación entre el ADN propio del no propio, al transferir grupos metilo desde SAM (S-adenosil-metionina) a las bases A o C en la misma secuencia reconocida por la enzima de restricción. Por lo tanto, la metilación protege al ADN frente a la degradación (Mruk I & Kobayasi I, 2014).

Estos sistemas se clasifican principalmente en cuatro tipos diferentes según la composición de la subunidad, reconocimiento de secuencia, posición de corte y especificidad de sustrato: **I) tipo I** cortan en sitios remotos del sitio de reconocimiento y generan bordes cohesivos; necesitan tanto de ATP y SAM para operar; consiste de una proteína multifuncional con 3 subunidades: M (modificación), S (especificidad) y R (restricción); **II) tipo II** escinden en el sitio de reconocimiento, o bien, cerca de este, la mayoría requieren de magnesio, no necesitan ATP y presentan una sola función (restricción) independiente de la metilasa; **III) tipo III** también cortan cerca del sitio de reconocimiento y producen extremos cohesivos; este tipo de proteínas realizan todas las actividades enzimáticas (restricción, modificación y NTPasa), necesitan de ATP, magnesio y SAM; y finalmente, **IV) tipo IV** solo cortan secuencias de ADN con bases metiladas (Vasu K, & Nagaraja V, 2013).

Incompatibilidad plasmídica.

Este proceso usualmente se define como la deficiencia de los mecanismos adecuados para la herencia de dos plásmidos co-residentes de manera estable en la misma línea celular, en ausencia de selección externa. Es decir, la incorporación de un plásmido secundario afecta de manera negativa la herencia del primer replicón, por lo tanto, se designan incompatibles. Este proceso ocurre cuando múltiples plásmidos dentro de una célula comparten el mismo sistema de replicación y/o segregación (Novick R, 1987). Históricamente los plásmidos se clasificaron basados en su capacidad/compatibilidad para coexistir con otro replicón en la misma bacteria. En 1988 Couturier y colaboradores desarrollaron un sistema para tipificar y clasificar plásmidos, con dicho modelo de tipificación,

estos elementos genéticos se clasificaron en diferentes grupos de incompatibilidad (Inc), aquellos plásmidos pertenecientes a diferentes grupos Inc pueden coexistir en la misma célula bacteriana (Couturier M, *et al.*,1988).

Incompatibilidad por control de replicación.

En este mecanismo los plásmidos son incompatibles debido a que compiten por la misma maquinaria de control de la replicación dentro de la célula. La mayoría de estos elementos codifican un sistema de regulación negativa modulado por RNAs antisentido o iterones, que restringen la frecuencia de la replicación cuando el número de copias en la bacteria es alto, por el contrario, permite la replicación cuando el número de copias disminuye. Debido a que dos plásmidos no pueden ser distinguidos como diferentes por el mecanismo de control de la replicación, cualquiera de ellos puede seleccionarse aleatoriamente por el sistema para la replicación. En otras palabras, si una célula alberga dos plásmidos de diferentes tipos, en el momento de la replicación se seleccionará aleatoriamente a uno de los dos. Por lo tanto, habrá dos copias del plásmido seleccionado y una sola copia del otro. En la siguiente ronda, el plásmido elegido tendrá mayor probabilidad de replicarse, mientras que el del otro tipo se perderá gradualmente (Novick R, 1987).

Incompatibilidad por sistemas de partición

Si dos plásmidos comparten el mismo sistema Par se vuelven incompatibles. Durante la división celular en condiciones normales, el mecanismo Par asegura que las células hijas obtengan al menos una copia del plásmido. Sin embargo, si el sistema es compartido por plásmidos coexistentes, mientras ocurre la división celular solo uno de los dos siempre será distribuido a las células hijas. Los plásmidos que comparten la misma región de unión al centrómero compiten por los mismos componentes del sistema, es decir, por las mismas proteínas de unión (ParB) y ATPasas (ParA) (que distribuyen de manera correcta a) para distribuir correctamente los plásmidos en cada célula hija. Cuando hay exceso

de proteínas ParB y ParA se genera inestabilidad y los plásmidos se colocan aleatoriamente, lo que llevará a la pérdida de ellos (Bouet J, *et al.*, 2007).

Conjugación y movilización plasmídica.

Las bacterias adquieren resistencia contra los antibióticos por medio de dos vías principales: por mutaciones cromosomales o mediante la obtención de plásmidos y otros elementos genéticos móviles, a través de transferencia horizontal genética. Los plásmidos juegan un papel muy importante en la evolución de bacterias MDR, ya que diseminan genes de resistencia entre los patógenos de mayor importancia clínica. Los plásmidos conjugativos son sin duda los vehículos más importantes en la diseminación de la resistencia a antibióticos entre familias bacterianas como el género *Acinetobacter*, que incluyen a algunos de los patógenos nosocomiales más importantes (Smillie C, *et al.*, 2010; San Millan A. 2010).

El único componente proteico de la maquinaria conjugativa que es común tanto en plásmidos auto-transmisibles como movilizables es la relaxasa. Esta proteína es un elemento clave en la conjugación debido a que reconoce al origen de transferencia (*oriT*), que una secuencia corta de ADN que es la única requerida en cis para que un plásmido sea conjugativo. La relaxasa cataliza el inicio y final de la conjugación (Smillie C, *et al.*, 2010; Partridge SR, *et al.* 2018).

En los plásmidos conjugativos la región de transferencia (*tra*) codifica para proteínas del componente *Mpf* (mating pair formation) que funcionan como un poro conjugativo del sistema de secreción tipo IV (T4SS), en la misma región también se codifican las proteínas *Dtr* (DNA transfer & replication) cuya función es procesar el ADN plasmídico. Las relaxas pertenece a esta familia de proteínas y escinden un sitio específico en la región *oriT* de la cadena de ADN que se exporta a la célula receptora. En los organismos Gram-negativos, el

sistema T4SS es el responsable de ensamblar un apéndice filamentosos que genera el contacto entre ambas células, denominado pilus conjugativo. En la célula donadora, el complejo nucleoproteico denominado relaxasoma, está compuesto por las proteínas *Dtr* y la región *oriT* escindida, este complejo está unido al transferosoma T4SS a través de la proteína de acoplamiento T4CP, de esta manera se forma el canal conjugativo, por el cual se transfiere el ADN a la célula receptora (Partridge SR, *et al.* 2018).

Los plásmidos no conjugativos son aquellos que no tienen la capacidad de llevar a cabo el proceso de conjugación por sí solos, sin embargo, se pueden transferir de manera horizontal con la ayuda del mecanismo *Mpf* proporcionado por el plásmido autotransmisible grande, presente en la misma célula. Este tipo de plásmidos se conocen como movilizables y únicamente cuentan con un subconjunto del componente DTR (denominada región MOB), solo incluyen el sitio *oriT* y una relaxasa. Por lo tanto, son más pequeños (<15pb) que los conjugativos (>30pb). En dichos replicones la relaxasa interactúa con el *oriT* y después el filamento nucleoproteico es transferido a la célula receptora por el sistema T4SS que es codificado por el otro plásmido. Se ha observado que las tasas de conjugación de los plásmidos movilizables son mucho menores que los plásmidos conjugativos (Partridge SR, *et al.* 2018; Garcillán-B, *et al.*, 2009).

Garcillán y colaboradores en el año 2009 compararon las secuencias y propiedades de las relaxasas contenidas en una base de datos genética. Esta información les permitió desarrollar un sistema para clasificar los sistemas de conjugación en seis familias MOB: MOB-C, MOB-F, MOB-P, MOB-Q, MOB-H y MOB-V (Garcillán-B, *et al.*, 2009). Un reporte en 2018 indicó que la familia MOB-Q pertenece a las relaxasas más frecuentes entre los genomas de *Acinetobacter spp* (Salto I, *et al.*, 2018).

Clasificación de plásmidos de *A. baumannii*

Bertini y colaboradores en 2010 analizaron las secuencias de 18 plásmidos de *A. baumannii* depositadas en la base de datos GenBank. Lograron identificar *in*

silico 22 replicones intactos, cada uno exhibió su sitio *ori* de origen de replicación y además a los genes *rep* que codifican para la replicasa. Los genes *rep* presentes en 17 replicones se encontraron adyacentes a los iterones. Además, clasificaron a estos replicones de acuerdo con la proteína Rep que portaban y de esta manera identificaron 19 grupos de homología diferentes (GR1-GR19) (Bertini *et al.*, 2010).

Un par de estudios más recientes reportaron la presencia de nuevos grupos de homología basados en la clasificación propuesta por Bertini y colaboradores. Lean y Yeo sugirieron dividir a la familia GR2 en dos grupos, debido a que el análisis proveniente de la filogenia realizada con las proteínas Rep de plásmidos pequeños de *Acinetobacter* reveló que este grupo se separó en dos cladas diferentes, por lo tanto, propusieron al grupo GR20 (Lean S & Yeo C, 2017). Un estudio adicional actualizó el esquema, identificó la presencia de tres grupos de homología nuevos, provenientes de plásmidos de cepas MDR de *A. baumannii* en Argentina. Apoyado en la nomenclatura establecida en 2010 definió a los grupos GR21, GR22 y GR23, las cuales se asociaron con cepas clínicas resistentes a carbapenémicos portadoras del gen *blaOXA-58* (María M, *et al.*, 2017).

Lean y Yeo identificaron que un gran número de los plásmidos pequeños presentes en *A. baumannii* codifican para replicasas que pertenecen a la **superfamilia Rep-3** (identificado por el dominio conservado pfam0151). La mayoría de los replicones de esta superfamilia presentan un gen *rep*, que usualmente se encuentra anotado como *RepB* precedido por iterones (de 19-22 nucleótidos localizados entre 10 y 200 pb río arriba del gen *repB*). Interesantemente, en una gran cantidad de estos plásmidos pequeños el marco de lectura que se encuentra río abajo del gen *repB* es altamente conservado y frecuentemente está anotado como *repA* (Lean S & Yeo C, 2017).

Los plásmidos de la superfamilia Rep-3 generalmente se encuentran asociados a sitios recombinación XerC/D flanqueando una gran variedad de módulos

genéticos. Estos módulos incluyen determinantes de resistencia a antibióticos como, *blaOXA-24/40*, *blaOXA-72* y *tet(39)*. Finalmente, es importante resaltar que los módulos TA del tipo II también se encuentran en la mayoría de los plásmidos de esta superfamilia (Lean S & Yeo C, 2017).

Existe otro grupo de plásmidos pequeños en *A. baumannii* que presentan un solo gen *rep* entre dos y cinco genes hipotéticos. La replicasa de este grupo de plásmidos pertenece a la **superfamilia Rep-1**. Esta familia a su vez se divide en dos subgrupos: p4ABAYE y Rep63. El plásmido p4ABAYE procedente de la cepa AYE, contiene un gen *rep* que pertenece al grupo GR14 y cuatro ORFs hipotéticos. El segundo subgrupo alberga a dos de los plásmidos más pequeños reportados en *Acinetobacter*, p3AB5075 de la cepa AB5075 y pM131-10 de *Acinetobacter sp.* M131. El plásmido representante de este subgrupo es p3AB5075, porta un gen *rep* (codifica para la proteína Rep63) y dos ORFs con funciones desconocidas, y se encuentra clasificado dentro de la familia GR16 (Lean S & Yeo C, 2017).

Pregunta de investigación.

¿Cómo se relaciona nuestra diversidad de plásmidos secuenciados de *A. baumannii* con respecto a su contenido genético, a su asociación a otros elementos genéticos móviles y, en conjunto, esta carga genética cómo le ha permitido evolucionar?



Structure and Evolution of *Acinetobacter baumannii* Plasmids

Abraham D. Salgado-Camargo¹, Semiramis Castro-Jaimes¹, Rosa-Maria Gutierrez-Rios², Luis F. Lozano¹, Luis Altamirano-Pacheco¹, Jesús Silva-Sanchez³, Ángeles Pérez-Oseguera¹, Patricia Volkow⁴, Santiago Castillo-Ramírez¹ and Miguel A. Cevallos^{1*}

¹ Programa de Genómica Evolutiva, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mexico, ² Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mexico, ³ Grupo de Resistencia Bacteriana, Centro de Investigaciones Sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Mexico, ⁴ Departamento de Infectología, Instituto Nacional de Cancerología, Mexico City, Mexico

OPEN ACCESS

Edited by:

Feng Gao,
Tianjin University, China

Reviewed by:

Chew Chieng Yeo,
Sultan Zainal Abidin University,
Malaysia

Mark D. Adams,
The Jackson Laboratory for Genomic
Medicine, United States

*Correspondence:

Miguel A. Cevallos
mac@ccg.unam.mx

Specialty section:

This article was submitted to
Evolutionary and Genomic
Microbiology,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 15 January 2020

Accepted: 20 May 2020

Published: 18 June 2020

Citation:

Salgado-Camargo AD,
Castro-Jaimes S, Gutierrez-Rios R-M,
Lozano LF, Altamirano-Pacheco L,
Silva-Sanchez J, Pérez-Oseguera Á,
Volkow P, Castillo-Ramírez S and
Cevallos MA (2020) Structure
and Evolution of *Acinetobacter*
baumannii Plasmids.
Front. Microbiol. 11:1283.
doi: 10.3389/fmicb.2020.01283

Acinetobacter baumannii is an emergent bacterial pathogen that provokes many types of infections in hospitals around the world. The genome of this organism consists of a chromosome and plasmids. These plasmids vary over a wide size range and many of them have been linked to the acquisition of antibiotic-resistance genes. Our bioinformatic analyses indicate that *A. baumannii* plasmids belong to a small number of plasmid lineages. The general structure of these lineages seems to be very stable and consists not only of genes involved in plasmid maintenance functions but of gene sets encoding poorly characterized proteins, not obviously linked to survival in the hospital setting, and opening the possibility that they improve the parasitic properties of plasmids. An analysis of genes involved in replication, suggests that members of the same plasmid lineage are part of the same plasmid incompatibility group. The same analysis showed the necessity of classifying the Rep proteins in ten new groups, under the scheme proposed by Bertini et al. (2010). Also, we show that some plasmid lineages have the potential capacity to replicate in many bacterial genera including those embracing human pathogen species, while others seem to replicate only within the limits of the *Acinetobacter* genus. Moreover, some plasmid lineages are widely distributed along the *A. baumannii* phylogenetic tree. Despite this, a number of them lack genes involved in conjugation or mobilization functions. Interestingly, only 34.6% of the plasmids analyzed here possess antibiotic resistance genes and most of them belong to fourteen plasmid lineages of the twenty one described here. Gene flux between plasmid lineages appears primarily limited to transposable elements, which sometimes carry antibiotic resistance genes. In most plasmid lineages transposable elements and antibiotic resistance genes are secondary acquisitions. Finally, broad host-range plasmids appear to have played a crucial role.

Keywords: *A. baumannii*, plasmids, Rep proteins, antibiotic resistance genes, plasmid maintenance functions, IS

INTRODUCTION

Acinetobacter baumannii is a global emergent nosocomial pathogen that causes a wide variety of infections, especially in severely ill patients, in intensive care units. This pathogen is a major cause of morbidity and mortality in hospitals worldwide, and the recent success of this species as a pathogen seems to be linked to the ability of this organism to acquire antibiotic resistance genes, form biofilms and resist desiccation; these characteristics facilitate the persistence of this bacterium in the hospital setting and promote the emergence of outbreaks (Antunes et al., 2014). A large fraction of the nosocomial outbreaks in Europe, Asia, and North America are produced by a limited number of strains belonging to three different international clones (IC-I, IC-II, and IC-III) (Zarrilli et al., 2013). Most of these international clones are resistant to antibiotics belonging to three or more different families, a characteristic that defines these clones as being multidrug resistant (MDR) (Diancourt et al., 2010; Roca et al., 2012).

Plasmids are extrachromosomal DNA molecules, usually circular, that replicate independently of the chromosome and have the potential to be transferred frequently, but not exclusively by conjugation, not only to members of the same species but also to distantly related bacteria (Partridge et al., 2018). Plasmids play a leading role in the spread of antibiotic resistance genes among bacterial pathogens that cause community- or hospital-acquired infections, including *A. baumannii* (Carattoli, 2013; San Millan, 2018). A wide variety of *A. baumannii* plasmids carrying antibiotic resistance genes with different sizes and characteristics have been described in recent literature. There has been particular interest in plasmids carrying genes encoding serine carbapenemases (OXA-type beta-lactamases), which facilitate the most predominant mechanism for carbapenem resistance in this species (Higgins et al., 2010; Mosqueda et al., 2014; Hujer et al., 2017; Cameranesi et al., 2018; Wibberg et al., 2018).

Despite the apparent importance of plasmids in the spread of virulence and antibiotic resistance genes among *A. baumannii* isolates, only a few papers that have analyzed the structures, relationships and evolution of *A. baumannii* plasmids as a whole have been published (Fondi et al., 2010; Lean and Yeo, 2017; Salto et al., 2018). In this work, taking advantage of the increasing interest in *A. baumannii* and the large number of complete genome sequences for this organism that have been deposited in GenBank in the last decade, we performed a comparative plasmid sequence analysis to gain insights into the structures, relatedness, and evolution of these plasmids. We were able to determine that the *A. baumannii* plasmids belong to a small number of plasmid lineages, some of them widely distributed among the different *A. baumannii* clades, while others seem to be restricted to a small number of clades. Surprisingly, some widespread plasmids do not have genes linked to conjugation or plasmid mobilization, suggesting that other mechanisms or horizontal transfer play an important role in the dissemination of *A. baumannii* plasmids. Genes encoding initiator replication proteins and the corresponding surrounding DNA sequences within each plasmid lineage are similar enough to suggest that each lineage represents plasmids of the same

incompatibility group. This suggestion is also supported by the observation that plasmids of the same strain have different replication proteins. Each plasmid lineage possesses a common gene set that contains not only genes involved in plasmid maintenance but also a set of genes encoding hypothetical or poorly characterized proteins. Despite the antibiotic or metal resistance genes that some plasmids possess, the remaining genes that are not involved in plasmid maintenance are not obviously linked with properties that allow survival in the hospital setting, suggesting that these genes could be associated with plasmid survival functions. Additionally, we determined that gene transfer from one plasmid lineage to another is highly limited and restricted to a few gene classes.

RESULTS AND DISCUSSION

The Plasmid Collection

Next-generation sequencing platforms have been a crucial means to obtain the complete sequences of all types of bacterial genomes, including those of many important human pathogens. We took advantage of the large amount of information generated in this manner to analyze the structure and evolution of the *A. baumannii* plasmids. For this purpose, we used the 155 complete plasmid sequences deposited in NCBI as of August 14, 2017. However, considering that most of these plasmid sequences were obtained from isolates of international clones and/or from a restricted set of countries, we incorporated the sequences of 18 plasmids obtained from the genome sequences of 10 nosocomial strains that represent some of the most prevalent STs circulating in Mexico to increase the plasmid diversity included in our investigation (see Materials and Methods). In total, our study collection comprised 173 plasmids of a wide variety of sizes, ranging from 1,109 to 216,780 bp. Moreover, our plasmid set originated from 103 different isolates, each carrying up to six plasmids. These isolates belonged to at least 47 different STs and originated from 17 countries (see **Supplementary Table S1**).

A. baumannii Plasmids Belong to a Very Restricted Number of Plasmid Lineages

Plasmids have been visualized as molecules that possess genes involved in self-maintenance (plasmid backbone) and genes that could be important for the ability of bacteria to exploit new ecological niches or acquire new capabilities (Frost et al., 2005). These genes are commonly described as plasmid *cargo*. Antibiotic resistance genes are a perfect example of such genes, particularly for organisms in hospital settings (Tschäpe, 1994; Carattoli, 2013; San Millan, 2018).

To understand how plasmids are organized and to define which are the relationship between them, several plasmid classification systems have been proposed. Some of these systems relay in the phenotypic features that plasmids confer, assuming that plasmids sharing such characteristics are phylogenetically related. Plasmid incompatibility or the inability of two plasmids to reside in the same cell has been another way to classify plasmids. Plasmids belonging to the same incompatibility group have identical or very similar replication and/or segregation gene

modules (Novick, 1987; Austin and Nordström, 1990). With this idea in mind, some authors have developed typing systems based on the nucleotide sequence identity of the genes encoding replication initiation proteins. Other authors designed methods to classify conjugative plasmids based on the sequence of the relaxase, a gene crucial for conjugation. The problem with these classification systems is that they are based on a limited number of genes or traits. However, considering the diversity of genes carried on plasmids and the different mechanisms that plasmid use for their maintenance makes a futile dream to design a universal plasmid taxonomy system. Nevertheless, we can design a classification system that takes into account, in an unbiased way, the whole gene content of plasmids, to determine which are the relationships between them and to have a picture of how these plasmids evolve. This was the approach that we follow in this work.

Plasmid evolution can be thought to occur via two basic pathways: first, plasmids are entities that are prone to rapid loss and gain of genes such that, in a short period of time, descendants of one plasmid are only recognizable because they share the same set of genes involved in the basic maintenance functions of the plasmid (Hülter et al., 2017; Brandt et al., 2019). Second, the ability of plasmids to gain or lose genetic information can be assumed to be more or less limited, and the plasmids persist for long durations within bacterial populations as plasmid lineages, where plasmid lineages are groups of plasmids that are closely related by gene content, including, but not restricted to, genes responsible for plasmid maintenance (Yau et al., 2010).

Our first interest was to evaluate, precisely, the type of evolution undergone by *A. baumannii* plasmids. For this purpose, our strategy was to compare the degree and extent of DNA sequence identity between the plasmids in our collection. We used nucleotide MEGABLAST (BLASTn) searches instead of Protein BLAST (BLASTp), as described by other authors, for two reasons: first, BLASTn comparisons are less sensitive to sequencing errors introduced during the assembly process (false frame shifts or incorrect stop codons) than BLASTp, and second, a BLASTp approach does not take into consideration intergenic regions and regions essential for plasmid function, such as the origin of replication. We made pairwise MEGABLAST (BLASTn) comparisons of each plasmid of our collection against the others. To filter BLAST results, we constructed networks with the following rule: two plasmids are linked if at least 85% of the regions of the largest plasmid (for each comparison) are covered by the smaller plasmid, and those regions exhibit at least 90% of DNA sequence identity. To belong to a specific network, one plasmid must fulfill the above-mentioned cutoff values of identity and coverage not with all, but with at least one member of the group. Being a member of a specific network does not mean that all plasmids of this network have at least 85% coverage with the rest of the members. The minimal requirement is to accomplish the cutoff values with at least one member of the network, for example, the shortest with the next in size.

After these analyses, we determined that 124 *A. baumannii* plasmids were organized into 23 groups, and 39 plasmids remained without an assigned group. The plasmid composition

of each group is listed in **Supplementary Table S1**. As shown in **Supplementary Figure S1**, the plasmid networks constructed as mentioned above are densely interconnected, and all members of a determined group have the same or a very closely related gene encoding a DNA replication initiator (Rep) protein. Notably, plasmids within a group share, in general, several genes that are involved in plasmid maintenance.

To evaluate the coherence of these groups, we repeated the analysis, raising plasmid coverage to 90% again, with 90% DNA sequence identity. In general, the groups remained almost the same (some groups lost a few members). On the one hand, lowering coverage to 50% and retaining 90% of DNA sequence identity, allows the incorporation of some orphans into different groups and led to the fusion of six lineages: Group_17 with Group_22, Group_7 with Group_8 and Group_3 with Group_14. Members of lineages Group_17 share sequence identity of approximately 70% with components of Group_22, including the replication module and nearby sequences. This grouping suggests that Group_17 and Group_22 have a common evolutionary origin. Likewise, members of Group_3 and Group_14 have similar but not identical Rep proteins, indicating also that they have a hypothetical common ancestor. In contrast, members of Group_8 do not have the same replication module as those belonging to Group_7 and for this reason we do not contemplate them having a common ancestry.

Groups formed using 85% coverage and 90% of sequence identity as cutoff values represent a useful method for identification of *A. baumannii* plasmid lineages. Lowering the coverage cutoff value to 50% may be useful to recognize ancestral relationships, as long as the shared sequences include the replication/maintenance module. Therefore, hereinafter, we will consider each one of the groups identified with this methodology as a plasmid lineage.

However, to indicate that Group_3 and Group_14 had a common origin but now each one of the groups has a different evolutionary path, these were named as plasmid lineages LN_3A and LN_3B, respectively. With these considerations, members of our plasmid collection belong to 21 plasmid lineages and 39 plasmids remain as orphans (not assigned to a plasmid lineage). Interestingly, 88 plasmids, or 50.8% of our collection, were clustered in only four plasmid lineages: LN-1, LN_2; LN_3 and LN_4. The other 17 groups are very small, as most of them contained only two members (**Supplementary Figure S1**).

With only one exception, we elected the largest and most interconnected member of the group as the representative plasmid of each lineage. The exception is lineage 2 (LN_2), in which the largest and most interconnected member has a very large duplicated region. The duplicated regions include the replication genes indicating that this sequence has assembly problems, considering that plasmids with duplicated replication regions are highly unstable and they are rapidly eliminated of the population (Summers et al., 1993). Therefore, the second largest most interconnected plasmid (pPKAB07) was selected as the representative of this particular lineage. In conjunction, these analyses indicate that *A. baumannii* plasmids evolve as lineages

and that most of the *A. baumannii* plasmids in circulation worldwide belong to a few lineages.

The general structure of the members of each one of the plasmid lineages is very stable, considering that some of the strains were isolated many years ago. For example, strain A1 was isolated in 1982, and one of the plasmids of this strain, pA1-1, belongs to lineage LN_2. This plasmid has a very similar gene content and organization as other plasmids isolated in 2015 that belong to the same lineage (plasmid unnamed2, GenBank accession number CP014293). Similarly, plasmid pALAC4-2 of LN_4 belongs to a strain isolated in 1997 and has a very similar structure to other plasmids of the same lineage isolated a decade later (i.e., plasmid pMRSN3527-6, GenBank accession number NZ_CM003318.1). Additionally, plasmid p4ABAYE (GenBank accession number NC_010403.1), described in 2001, shared 98% sequence identity with pMRSN58-2.7 (GenBank accession number NZ_CM003316.1), isolated in 2013. Members of LN_19 are almost identical. The oldest member of the lineage was isolated in 2001 and the most recent in 2010 (Supplementary Table S1).

The *A. baumannii* plasmid sequences deposited in NCBI have increased since we last performed the analyses. On April 28, 2020, this database embraced the complete sequence of 422 *A. baumannii* plasmids. To make a rapid evaluation of the prevalence of plasmid lineages LN_1, LN_2, LN_3A, LN_3B, and LN_4, we performed BLASTn on all members of these lineages against the new database. Using this strategy 30 new plasmids were incorporated in LN_1, 23 in LN_2, 12 in LN_3A+3B, and finally, 10 new plasmids were included in LN_4. Now, these lineages contain 38.4% of the *A. baumannii* plasmids. However, we must say that the only way to identify all new members of the plasmid lineages is by reconstructing the networks with the rules mentioned above. These observations confirm that a few plasmid lineages encompass most of *A. baumannii* plasmids.

Plasmid Lineage Gene Composition

Comparisons of all members of a particular plasmid lineage with their representative plasmid show that the genome core of a plasmid lineage includes genes that are not involved in plasmid maintenance functions (the backbone) (Figure 1 and Supplementary Figures S2–S12).

To obtain a general picture of the gene composition of our plasmid collection, we assigned a functional class (COG) to each of the protein products encoded by these plasmids. This analysis showed that these proteins fall within 23 functional classes; however, we were unable to assign a functional class (not in COG) to 74.15% of the proteins (Figure 2). In total, 3.53% of the encoded proteins have only a general function prediction (class R), and 3.5% are classified within class S (function unknown). Nevertheless, these 2497 uncharacterized or poorly characterized proteins were grouped in 242 orthologous groups [Remained Orthologous Groups (ROGs)] (Taboada et al., 2010). Therefore, it is not possible to predict whether some of these hypothetical proteins play a role in the nosocomial setting. However, given that the genes encoding these proteins are highly conserved within each plasmid lineage; the general structure of plasmids belonging

to each one of the different lineages is stable during time and that the plasmids replicate in very different genetic backgrounds (even in different species), we suggest that these genes may play a role in reducing the fitness cost for the host to maintain the plasmids, thereby improving the favorability of the plasmids as parasite molecules.

We also found, as expected, a set of genes encoding proteins that are typically associated with plasmids: 7.28% of the proteins fall under class L (replication, recombination and repair), which includes replication initiation proteins, transposases, site-specific recombinases, and other proteins involved in recombination. Additionally, 1.31% of the proteins belong to class V (defense mechanisms), which includes proteins involved in plasmid stability (toxin-antitoxin modules) and restriction modification and proteins conferring antibiotic resistance. In the following sections, we will describe genes that play a crucial role in plasmid maintenance and that are usually associated with plasmid functions (Figure 2).

Classification of New Replication Initiation Protein (Rep) Genes

An absolute requirement for the survival of a plasmid is the presence of a replication module. These modules consist of an origin of replication, one gene encoding a replication initiator (Rep gene) and the factors and DNA sites involved in regulation of the expression of this gene, which is located near the Rep gene (del Solar et al., 1998). Our bioinformatic analysis indicates that from the 173 plasmids in our collection, 143 had an intact Rep gene and 13 plasmids had Rep pseudogenes, because we found on them premature stop codons or frameshifts generated, probably, during the sequencing and/or assembly processes. Nevertheless, in 27 plasmids, we could not find a Rep protein by annotation or BLAST searches; thus, as already noted by other authors, an experimental approach is needed to identify such replication regions (Lean and Yeo, 2017).

Rep genes of *A. baumannii* plasmids have been mainly identified by bioinformatic analyses, which have indicated that these proteins can be classified into five different categories: the most common Rep proteins belong to the Rep_3 superfamily (Pfam:01051) and are usually annotated as RepB. The next most frequent Rep proteins are those annotated as *replicases*, and these proteins have two distinctive domains: one is a replicase domain (pfam:03090), and the other is an alpha-helical domain that is also present at the C termini of primases (PriCT_1 superfamily). Other *A. baumannii* plasmids have Rep proteins belonging to the Rep_1 superfamily (Pfam01446). Several plasmids have a protein with a helix-turn-helix (HTH) domain annotated as a replication protein, and finally, one plasmid has an initiator protein classified as belonging to the RepC superfamily (Pfam:06504). Recently, the functionality of some of these replication regions was tested experimentally (Salto et al., 2018). Nevertheless, as mentioned above, many plasmids do not have an identifiable Rep protein. Figure 3 and Supplementary Figure S13 show the phylogenies of the replicases with the most members, separated by the domains identified by Pfam (Rep3 and replicase-PriCT). Some proteins were not included because either these proteins did not have

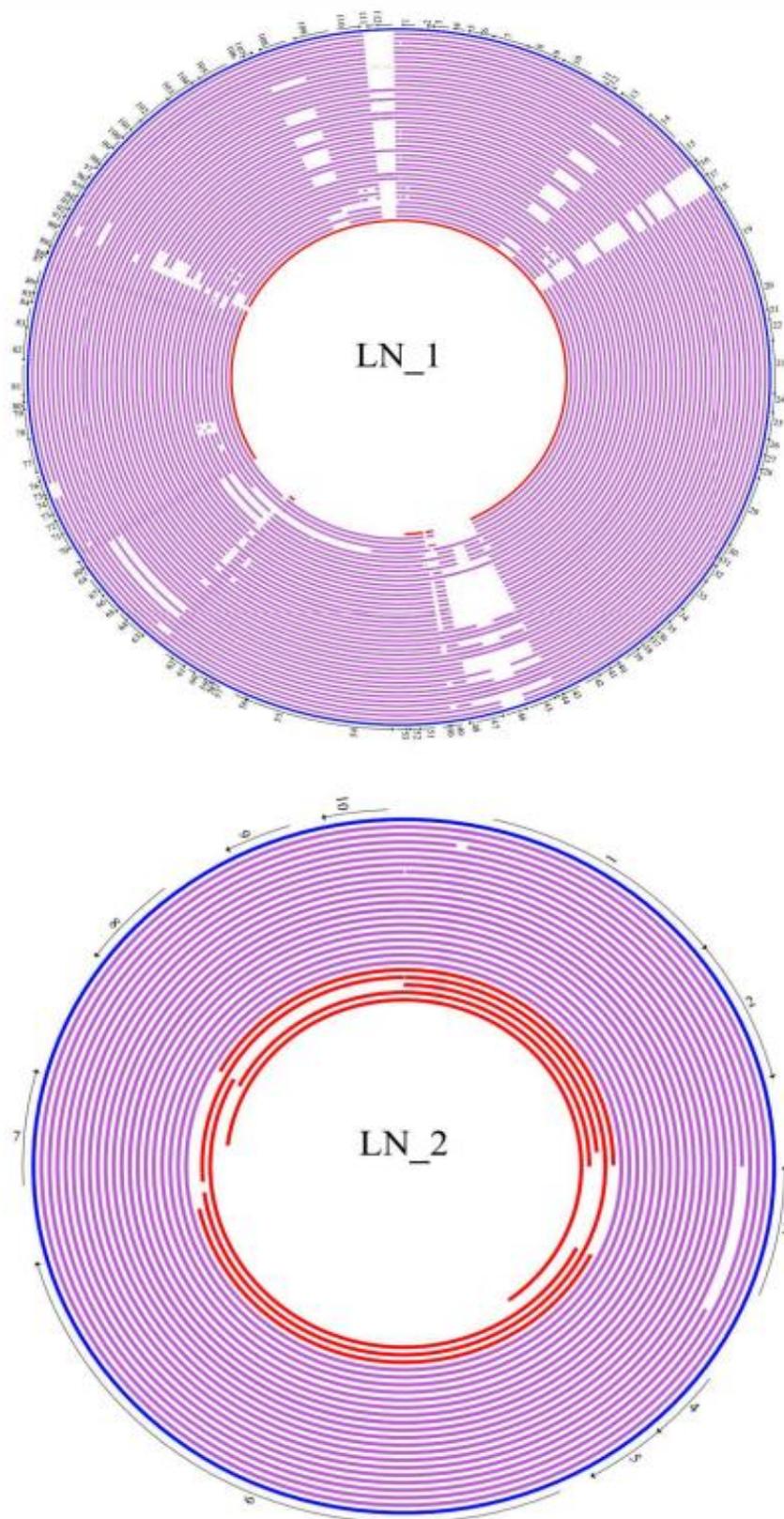


FIGURE 1 | Continued

FIGURE 1 | Circular map of members of plasmid lineage LN_1 and linear map of members of LN_2. Plasmid sequences of each lineage were compared with its reference with BLASTn and mapped using GenVision a component of DNASTAR's Lasergene Core Suite. The genes core are in bold letters. The representative plasmid of LN_1 is plasmid AB34299 (blue ring) and numbers around this plasmid indicate the position of the following genes: **1. Nuclease; 2. Hypothetical protein; 3. Hypothetical protein; 4. Hypothetical protein; 5. Hypothetical protein; 6. Hypothetical protein; 7. Zeta-antitoxin; 8. Zeta-Toxin; 9. Hypothetical protein; 10. Plasmid replicase; 11. Hypothetical protein; 12. Hypothetical protein; 13. Hypothetical protein; 14. DNA polymerase; 15. Hypothetical protein; 16. ISAbA1; 17. ISAbA1; 18. Transglycosylase; 19. Conjugal protein TraG; 20. Conjugal protein TraH; 21. Hypothetical protein; 22. Conjugal protein TraF; 23. Conjugal protein TraN; 24. Conjugal protein TrbC; 25. Conjugal protein TraU; 26. Conjugal protein TraW; 27. Peptidase; 28. Hypothetical protein; 29. Conjugal protein TraC; 30. Conjugal protein Tra; 31. Hypothetical protein; 32. Protein-disulfide isomerase; 33. Conjugal protein TraB; 34. Conjugal protein TraK; 35. Conjugal protein TraE; 36. Conjugal protein TraL; 37. Hypothetical protein; 38. Hypothetical protein; 39. Murein transglycosylase; 40. Hypothetical protein; 41. Hypothetical protein; 42. Resolvase; 43. Hypothetical protein; 44. Hypothetical protein; 45. ISAbA125; 46. Aminoglycoside phosphotransferase; 47. ISAbA125; 48. Hypothetical protein; 49. Hypothetical protein; 50. Hypothetical protein; 51. Hypothetical protein; 52. Hypothetical protein; 53. Hypothetical protein; 54. Relaxase MOBf; 55. Type IV secretion system protein VirD4; 56. Hypothetical protein; 57. Hypothetical protein; 58. Hypothetical protein; 59. Hypothetical protein; 60. Hypothetical protein; 61. Molecular chaperone DnaJ; 62. Hypothetical protein; 63. Hypothetical protein; 64. Hypothetical protein; 65. Hypothetical protein; 66. Hypothetical protein; 67. Hypothetical protein; 68. Addition module toxin; 69. DNA-binding protein; 70. Hypothetical protein; 71. Hypothetical protein; 72. Hypothetical protein; 73. Hypothetical protein; 74. Hypothetical protein; 75. Hypothetical protein; 76. Hypothetical protein; 77. Hypothetical protein; 78. Toxic anion resistance protein TelA; 79. Hypothetical protein; 80. Hypothetical protein; 81. Hypothetical protein; 82. ParB family partition protein; 83. ParA family protein; 84. Hypothetical protein; 85. Hypothetical protein; 86. Hypothetical protein; 87. Hypothetical protein; 88. Hypothetical protein; 89. Hypothetical protein; 90. Hypothetical protein; 91. Hypothetical protein; 92. Hypothetical protein; 93. Hypothetical protein; 94. DNA-binding protein; 95. Nuclease; 96. Hypothetical protein; 97. Hypothetical protein; 98. Hypothetical protein; 99. Hypothetical protein; 100. Hypothetical protein; 101. Hypothetical protein; 102. Zeta-antitoxin; 103. Zeta-toxin; 104. Hypothetical protein; 105. Hypothetical protein; 106. Hypothetical protein; 107. Hypothetical protein; 108. Hypothetical protein; 109. DNA polymerase; 110. Hypothetical protein; 111. Transposase; 112. Transposase. Purple rings: Purple rings: from outside to inside: pNaval18-74, p2ABTCCDC0715, pAC30c, pAba10042b, pAba9102a, pAba7847b, pACICU2, ABKp1, p1ABST2, pNaval81-67, pOIFC143-70, pIS123-67, pABUH1-74, p1AB5075, pAB04-2, plasmid YU-R612, pAba3207b, pCMCVTA2-Ab4, plasmid CMC-CR-MDR-Ab66, plasmid KAB01, plasmid KAB02, plasmidKAB03, plasmid KAB04, plasmid KAB05, plasmid KAB06, pSSA12_1, pSSMA17_1, pJBA13_1, p15A34_1, pUSA2_1, pUSA15_1, pA85-3, pCS01A, pCS01B, pCR17A, pCR17B, pAba7835b, plasmid KAB07, plasmid KAB08, p15A5_1. Additional orphan plasmid is in red ring: pAC29b. LN_2. The representative plasmid of lineage LN_2 is pPKAB07 (blue bar). Numbers along this bar indicate the position of genes: **1. RepB family plasmid replication initiator protein; 2. DNA-binding protein; 3. Hypothetical protein; 4. Toxin-Antitoxin system spITa (COG3514); 5. Toxin-Antitoxin system spITa (DUF497); 6. TonB dependent receptor; 7. Hypothetical protein; 8. Hypothetical protein; 9. Hypothetical protein; 10. Hypothetical protein.** Purple bars: from top to bottom: p1ABTCCDC0715, pAC12, pAC30a, p2ABAYE, pAB0057, p1BJAB0868, pCanadaBC5-8.7, pABUH6a-8.8, pMRSN7339-8.7, pMRSN58-8.7, pAB0057, plasmid_2 AB34299, p2AB5075, pAC29a, pA1-1, p15A5_2, pSSA12_2, pA85-2, pAB5075. Additional orphan plasmids are in red bars: from top to bottom: pAB2, p1ABST78, pORAB01-3, p MEX11594, pYU-R612.**

any Pfam domain assigned in the database or there were not enough members to perform comparisons, as in the extreme case of the RepC domain, with only one protein assigned to this domain (El-Gebali et al., 2019).

In 2010, Bertini and coworkers designed a classification system for the *A. baumannii* plasmids based on the nucleotide identity of the Rep genes (Bertini et al., 2010). Rep genes that shared at least 74% nucleotide identity were pooled in the same group. With this scheme, the authors identified 19 homology groups (GR1 to GR19). Subsequently, Lean and Yeo, studying *A. baumannii* plasmids of less than 10 kb, proposed a new group based on Rep phylogenetic analyses: GR20, which is closely related to GR2; however, the members of this group form a clear separate clade (Lean and Yeo, 2017). Recently, Cameranesi and collaborators analyzed *A. baumannii* plasmids from Argentina and determined that some Rep genes of these plasmids required the formation of three additional groups: GR21, GR22 and GR23 (Cameranesi et al., 2018). However, the analysis of the genes annotated as Rep proteins from our plasmid collection showed that the current classification system was not sufficient to include all the Rep proteins. Therefore, by following the scheme proposed by Bertini and coworkers, ten additional groups were constructed (GR24-GR33). These replication gene groups can be visualized as a network in which one gene encoding a replication protein is part of a group if its DNA sequence shares at least 74% identity and 90% coverage with another member of the same group. For each new Rep group (GR), we chose the most interconnected member as the representative

sequence of the group. However, we identified some unusual Rep proteins that showed nucleotide sequence identity higher than 74% with members of two different groups. This inconsistency was provoked because some authors named new replication homology groups, using a different set of rules of those originally proposed by Bertini and coworkers. Examples, the representative protein of GR23 is identical to that of GR8_1 proposed by Bertini and coworkers or the representative members of groups GR2 and GR20 have a DNA sequence identity higher than 74%. (Fondi et al., 2010; Cameranesi et al., 2018). In these cases, we assigned the unusual protein to the group with which this element shared the highest nucleotide identity (**Supplementary Table S2**). The assignments of all the replication proteins encoded in our plasmid set are listed in **Supplementary Table S1**. Seven of the new groups harbor DNA initiator proteins of the Rep_3 family (GR26, GR27, GR28, GR29, GR30, GR31, GR32); two of these groups are composed of proteins of the Replicase_PriCT family (GR25 and GR32), but the representative member of GR25 has an HTH_29 additional conserved domain (Pfam13551) and finally, one plasmid carries a Rep protein of the RepC family (GR33). We were incapable of identifying a gene encoding a Rep protein in three plasmid lineages (LN_4, LN_7 and LN_18) and in 14 orphan plasmids. On the other hand, four plasmid lineages, namely, LN_2, LN_11, LN_13 and LN_20, exhibited the same organization in their replication modules. This module consists of a bicistronic operon, in which the first gene encodes an initiator protein of the Rep_3 family (or RepB), and the second gene of the operon encodes a protein with an HTH motif that on

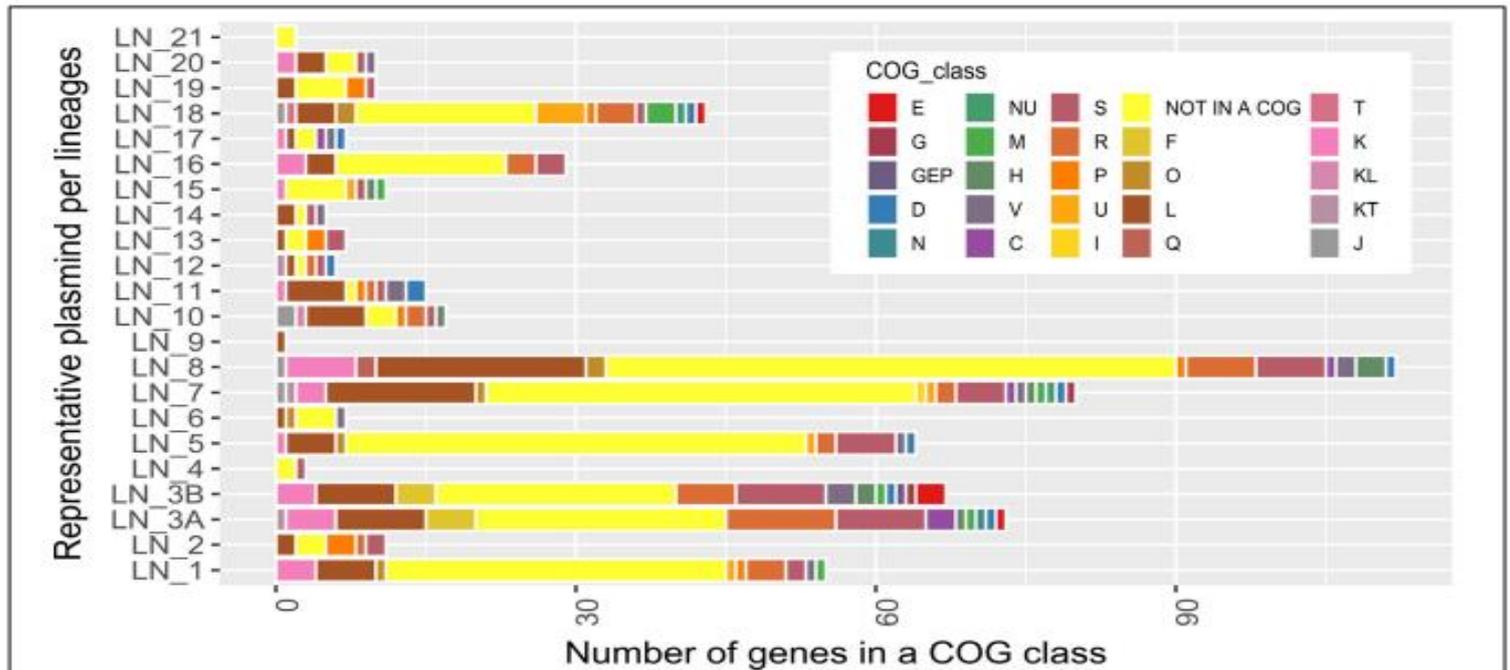


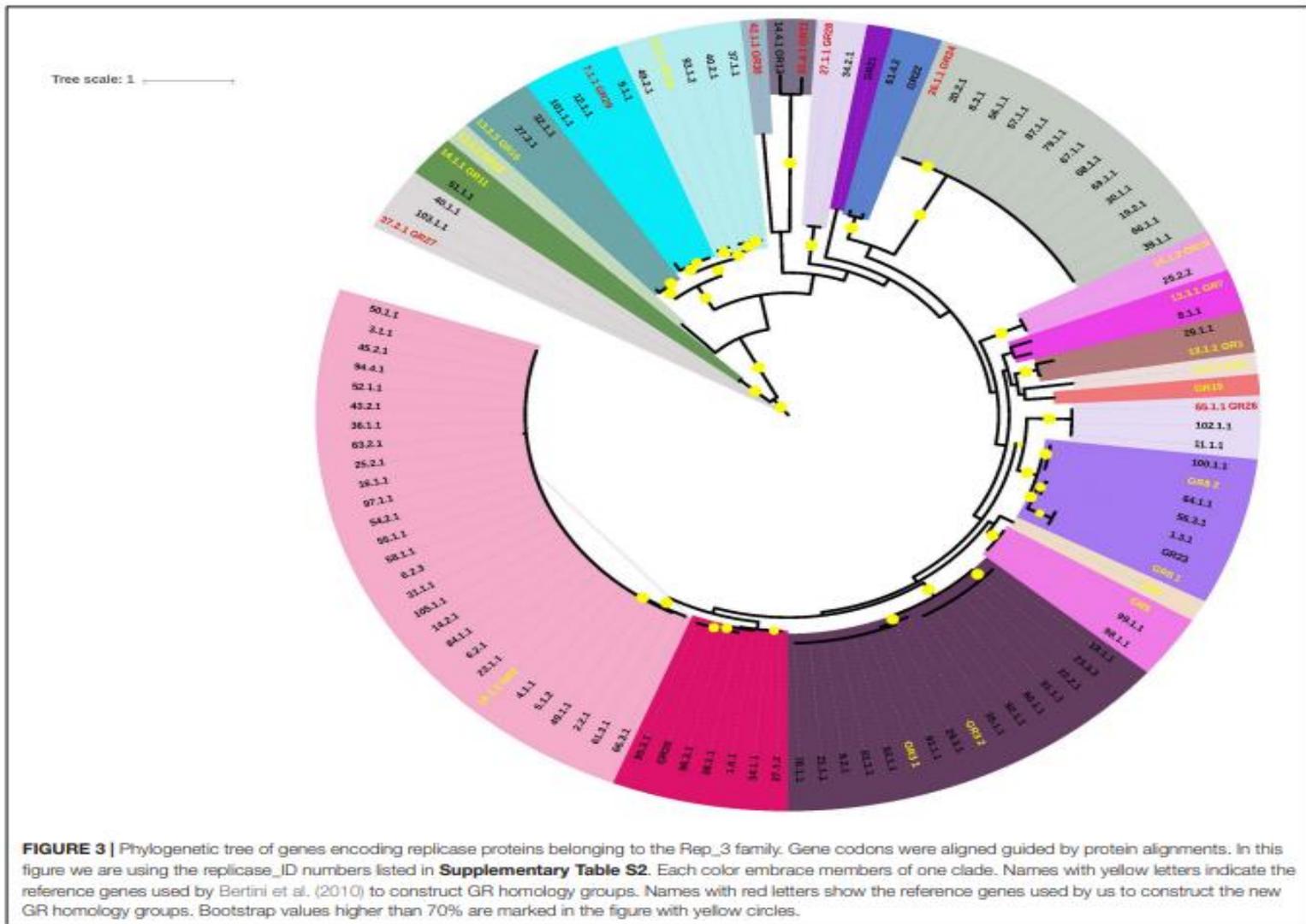
FIGURE 2 | Number of genes assigned to a functional class (COG) present in the representative plasmid of each lineage. Classes: CO, energy production and conversion, posttranslational modification, protein turnover, chaperones. DJ, cell cycle control, cell division, chromosome partitioning, translation, ribosomal structure and biogenesis. Q, secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism. I, Lipid transport and metabolism. GEP, carbohydrate transport and metabolism, amino acid transport and metabolism, inorganic ion transport and metabolism. KT, transcription, signal transduction mechanisms. NU, cell motility, intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport. G, carbohydrate transport and metabolism. KL, transcription, replication, recombination and repair. J, translation, ribosomal structure and biogenesis. T, signal transduction mechanisms. E, amino acid transport and metabolism. D, cell cycle control, cell division, chromosome partitioning. H, coenzyme transport and metabolism. F, nucleotide transport and metabolism. C, energy production and conversion. M, cell wall/membrane/envelope biogenesis. U, intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport. O, posttranslational modification, protein turnover, chaperones. P, inorganic ion transport and metabolism. V, defense mechanisms. K, transcription. S, function unknown. R, general function prediction only. L, Replication, recombination and repair. NOT IN A COG, COG not defined.

some occasions has been wrongly annotated as a putative Rep protein, for example, in the homology group GR17. We traced the error source to an obvious mistake in GenBank: plasmid pAB1 (GenBank accession number CP000522.1) carries a gene annotated as encoding a DNA replication protein (protein_id ABO13850.1) which is precisely the representative member of GR17. This putative DNA replication protein carries an HTH_17 conserved domain (Pfam12728). However, a BLAST search indicates that the gene upstream to that encoding the HTH-carrying protein encodes a protein belonging to the Rep_3 superfamily (protein_id ABO13860.1) which is identical to other *A. baumannii* replication proteins. Unfortunately, this gene is annotated as encoding a hypothetical protein. To facilitate future work, Rep proteins sequences and the genes that codify them are listed in **Supplementary Materials S1, S2**. Be careful: these lists still include the representative member of GR17 described above.

Iterons in the New GR Replication Homology Groups

It has been shown that *iterons*, which are small repetitive DNA sequences located near the Rep gene, usually in tandem,

play a crucial role in the control of plasmid replication in many plasmids (Chattoraj, 2000; Wegrzyn et al., 2016). These sequences have been bioinformatically identified in some *A. baumannii* plasmids; therefore, we searched for the presence of these sequences in the representative Rep genes and their surrounding sequences in each of the new GR groups (GR24-GR33) (Lean and Yeo, 2017; Salto et al., 2018). We could identify such tandem repeats near the initial codon of the Rep protein in six of these groups (GR24, GR26-GR30). The putative iterons of each one of the new groups are shown in **Supplementary Table S3**. Interestingly, in these cases, we also identified a region rich in A+T near these tandem repeats, which is a typical characteristic of plasmid replication origins. Of course, these presumptions must be tested in the laboratory. In contrast, GR25, GR31, GR32, and GR33 do not have iterons, at least not near the Rep gene. The first two Rep genes belong to the Rep_PriCT family and GR33 is the only member of the RepC family in our collection. Plasmid pD36-4 is a bireplicon that encodes two Rep proteins of the Rep_3 superfamily: RepA1 (WP_000140303.1) (GR31) and RepA2 (protein_id WP_000786839.1) (Hamidian and Hall, 2018a). The RepA2 gene is preceded by three copies of a 19 bp iteron



sequence, but surprisingly, RepA1 does not possess iterons at least 500 bp upstream of the initiation codon, 500 bp downstream of the stop codon or within the Rep coding region, suggesting that this protein is no longer responsible for pD36-4 replication (Hamidian and Hall, a).

Plasmid Incompatibility and Initiator Proteins

Plasmid incompatibility has been defined as the inability of two replicons to coexist in the same cell line. This phenomenon occurs when some elements of the replication or partitioning machineries of a plasmid interfere with the maintenance functions of a second plasmid (Novick, 1987; Austin and Nordström, 1990). Thus, different plasmids that are stably maintained in the same bacterial cell belong, by definition, to different incompatibility groups. On the other hand, plasmids that are mutually incompatible are classified within the same

incompatibility group and, very frequently, are phylogenetically closely related.

An inspection of the initiator genes in each of the plasmid lineages with only one Rep gene shows that all members of the same plasmid lineage share a replication initiator protein, classified within the same Rep homology group as defined by Bertini and coworkers (Bertini et al., 2010). For example, Rep proteins of lineage 1 belong to Rep group GR6; Rep proteins of lineage 2 belong to GR2; Rep proteins of lineage 3 belong to GR24, and those of LN_5 are classified within GR25 (**Supplementary Table S1**). In many cases, Rep proteins of the same GR group have amino acid sequences that are identical or almost identical: for example, all Rep proteins within LN_2 or LN_3A are identical, and those of LN_1 share 99.1% sequence identity among each other.

Plasmid lineages (LN_8, LN_10, LN_16) share Rep proteins of the same GR homology group (GR3); however, a protein

alignment performed with Clustal Omega indicates that Rep proteins of LN_8 and LN_10 are almost identical (>99.6%). Differences between LN_8 and LN_10 and LN16 is 80.2%. In our collection, members of these plasmid lineages are never located in the same bacterial isolate; however, differences in the sequences of Rep proteins between these two groups could be significant enough to represent two incompatibility groups. Recently, Blackwell and Hall (2019) showed that plasmids pS32-1 and pS21-a are compatible and that these plasmids contain Rep proteins of the Rep_3 superfamily. Interestingly, these proteins share a protein sequence identity of 85.4% (Blackwell and Hall, 2019). Nevertheless, an experimental approach is needed to resolve these problems. Our analysis indicates that plasmids of the same isolate belong to different plasmid lineages, with two exceptions, namely, isolates CR17 and CS01, which are almost identical in sequence. Each isolate possesses three plasmids, and two of the plasmids in each strain belong to LN_1; however, we were unable to identify complete Rep genes in these four plasmids; we could identify only truncated Rep genes or pseudogenes. Therefore, we could not elucidate the mechanisms via which these plasmids replicate or coexist in the same isolates. Taken together, these observations suggest that members of a plasmid lineage belong to the same incompatibility group.

Bi- and Trireplicons

It has been previously observed that some *A. baumannii* plasmids contain more than one gene encoding a Rep protein. In fact, there are some examples of such plasmids in our collection: 5 plasmids possess two Rep genes, and one plasmid, p3ABSDF, contains 3 Rep genes (Supplementary Table S4). Each one of the Rep genes residing in the same plasmid belongs to a different Rep group. Some of the isolates that have bi- or trireplicons also contain other companion plasmids; these companion plasmids always include replication modules belonging to different Rep groups, between each other and with those present in the multi-replicon plasmid. The French isolate SDF is an extreme example present in our collection. This isolate has three plasmids: p1ABSDF, p2ABSDF and p3ABSDF. The first plasmid possesses a replication module classified within Rep group GR1. The second plasmid, p2ABSDF, has two replication modules, one belonging to GR12 and the other to GR18. The third plasmid has 3 replication modules that belong to different Rep groups: GR7, GR9 and GR15. All the GR homology groups present in each isolate differ, preventing potential functional interference between the groups. These observations reinforce our hypothesis that each plasmid lineage belongs to a different incompatibility group and also suggest that these plasmids are the products of ancient plasmid cointegrations.

We also identified a plasmid lineage, LN_3 with a Rep protein belonging to homology group GR24. Members of this lineage contain a large set of phage-related genes, including several that could be implicated in replication, such as a DNA primase, a DNA helicase, a DNA ligase, the catalytic domain of DNA polymerase III (subunit α), and exonucleases, as already observed by Huang and coworkers (Huang et al., 2014). Plasmids that

are capable of using phage-related proteins in replication can be considered bireplicons.

Partitioning Modules

Plasmids of high molecular weight and low copy number require an active segregation machinery to ensure that newly replicated plasmids are adequately segregated into the daughter cells. To date, three different active segregation machinery types have been identified, all of which consist of an NTPase, a centromere-like binding protein and at least one centromere-like sequence. These segregation machineries have been classified into three types according to their NTPase proteins: type I, which has a Walker-type ATPase (ParA); type II, which contains actin-like ATPases (ParM); and type III, which possesses a GTPase similar to tubulin (TubZ) (Baxter and Funnell, 2014). However, by far, the most common segregation machinery is that belonging to type I. This type consists of three different elements: ParA, a Walker-type ATPase; ParB, which is a centromere-like binding protein; and a DNA centromere-like site (*parS*). These systems are usually organized in an operon in which the first gene is *parA*, followed by *parB*, and the *parS* site is usually located near the *parA/parB* genes. Generally, plasmids that use this segregation system possess only one copy of the operon (Bignell and Thomas, 2001).

Of the *A. baumannii* plasmids studied here, lines LN_1, LN_5, LN_7 and LN_8 have *parA/parB* genes in the classic conformation, but members of LN_8 contain duplicates of these genes. In contrast, other lineages possess incomplete *parA/parB* systems: LN_3 members have one copy of *parA* and two copies of *parB*; LN_11 contains only one *parA* gene per plasmid and LN_18 members contain one *parB* copy. Interestingly, all members of LN_8 also encode a ParM-like protein, suggesting that these plasmids may possess a second segregation system belonging to type II. These observations revealed an extensive diversity of plasmid segregation systems in *A. baumannii* (Supplementary Table S1).

Toxin-Antitoxin Modules

Plasmids have developed several genetic modules to ensure their persistence within a bacterial population, and some of these modules are classified as toxin-antitoxin (TA) modules. These modules consist of two genes: one encoding a toxin and the other its cognate antitoxin. Toxins are more stable than antitoxins; therefore, cells that lose a plasmid encoding one of these modules are eventually eliminated from the population (Hayes and Van Melderen, 2011; Unterholzner et al., 2013). The presence of these modules on plasmids not only ensures the persistence of the plasmids within a cell line but may also play a role in bacterial virulence (Lobato-Márquez et al., 2016). TA modules have been previously described in *A. baumannii* plasmids; therefore, we searched for the presence of these modules in our 173 plasmids (Jurenaite et al., 2013; Sužiedėlienė et al., 2016; Armalytė et al., 2018). We determined that 108 of them have TA modules belonging to nine different classes. Eight of these modules were TA modules of type II: ZetaTA (43.5%), SpITA (30.5%) and HigB/A (11.1%), and other TA modules that were less well represented (13.9%, in total), including YafQ/RelB, RelB/E, HicAB, HipA/B, and Phd/YoeB. Four plasmids have the

TA module AbiEii/AbiGii (type IV). Plasmids with TA modules exhibit the general tendency to have one per plasmid, with one exception: the orphan plasmid p3ABAYE has three different TA systems, namely, HigB/A, HipA/B, and RelB/E. Plasmids with the same TA module, in general, do not coexist. We have two isolates, namely, CR17 and CS01, that each possess one plasmid of the same lineage and with the same TA modules (**Supplementary Figure S14** and **Supplementary Table S5**).

Plasmid-carried restriction-modification modules play a role in plasmid stabilization via postsegregational killing (Kulakauskas et al., 1995) therefore, we searched for these modules in the plasmid collection, and only 7.9% of the plasmids harbor these modules. We showed that only five members of LN_1 and two plasmids of LN_3B have these modules. Three orphan plasmids, namely, pOIFC032-101, p2ABSDF and p3ABSDF, also have restriction-modification modules. Some plasmids, such as those belonging to LN_8 and the orphan plasmid pHWBA8_1, encode only for the DNA methyltransferase. These results suggest that some members of LN_1 and LN_3B acquired restriction-modification modules after the origination and diversification of the lineages.

Conjugation Modules

Conjugation is probably the most efficient process for dissemination of plasmids among strains of the same species or even to not closely related species. This process requires two gene sets: one involved in mating pair formation, which encompasses all genes required for the synthesis of a specialized type 4 secretion system that is essential for establishment of contacts between donor and receptor cells. The second gene set encodes products required for DNA processing and replication. Plasmids with these two functional gene sets are self-transmissible. However, other plasmids, containing only a transfer origin (*oriT*), a relaxase gene and some genes encoding nicking accessory proteins, require for mobilization of their proteins a specialized type 4 secretion system encoded by a second (helper) plasmid. These plasmids are known as mobilizable plasmids (Smillie et al., 2010; Cabezón et al., 2015). We performed a bioinformatic search for genes involved in conjugation in our plasmid collection, and the results are summarized in **Supplementary Table S5**. We discovered that only two plasmid lineages, LN_1 and LN_5, have large sets of conjugation genes (>10 genes), but only members of LN_1 have been experimentally shown to be capable of conjugation (Di Venanzio et al., 2019). One of the 39 orphan plasmids, pKBN10P02143, has a large set of conjugation genes, suggesting that this plasmid is also conjugative. We also found some plasmids that have a small set of six conjugation genes but not a gene encoding a relaxase, such as members of lineages LN_7 and LN_8, suggesting that in the mobilization capacity was lost during evolution.

Eight of the 21 plasmid lineages identified in this work have the potential to be mobilizable, considering that these lineages have relaxase genes and their cognate *oriT* sequences. Six of these plasmid lineages (LN_12, LN_14, LN_15, LN_17, LN_18 and LN_3B) have relaxase genes belonging to the MOB_Q family, and all of these genes are closely related to other relaxases described only for *A. baumannii* plasmids (Salto et al., 2018). Lineages LN_1

and LN_5 have relaxase genes of the MOB_F family, and members of LN_4 possess a relaxase gene of the MOB_H family. Thirteen orphan plasmids have MOB_Q relaxase genes and only one relaxase gene of the MOB_P family. Notably, 14 plasmid lineages do not have relaxase genes; however, some of these lineages are dispersed throughout the *A. baumannii* phylogenetic tree constructed with ribosomal genes not containing recombination signals. However, it has been shown that some *Staphylococcus aureus* plasmids, even in the absence of a relaxase and relaxase accessory genes, have sequences that mimic *oriT* sequences and that can be used for mobilization when they coexist with a conjugative plasmid that encodes Mob proteins able to recognize these *oriT* sequences (O'Brien et al., 2015a,b). Recently, Blackwell and Hall (2019) showed that the conjugative plasmid (pAb-G7-2) was capable to mobilize plasmid pS32-1, which lacks Mob encoding genes, through a relaxase *in trans* mechanism (Blackwell and Hall, 2019). Making sequence comparisons, these authors suggest that plasmid pS32-1 has a 32 pb DNA sequence that closely matches in sequence and organization the *oriT* of plasmid R388, an IncW plasmid whose *oriT* has been experimentally dissected. Blackwell and Hall also showed that the putative *oriT* and their adjacent sequences are present in other *A. baumannii* plasmids (Blackwell and Hall, 2019). To expand these observations, we search for the presence of these sequences in our plasmid collection set and here we show that they are present in all members of LN_2, LN_11, LN_19, LN_20 and some other plasmid, including a couple of orphans, indicating that potentially this mechanism is the responsible to disperse this plasmid lineages through different *A. baumannii* clades. DNA alignment of the putative *oriT* sequences located in these plasmids is shown in **Figure 4**. Nevertheless, these observations in conjunction also suggest that other plasmid transmission mechanisms that are not dependent on type IV secretion systems, such as transduction, transformation or outer membrane vesicles may play an important role in the spread of plasmids between *A. baumannii* populations (Rumbo et al., 2011; Chatterjee et al., 2017).

All *A. baumannii* strains studied here contain in their chromosomes genes encoding a type VI secretion system (T6SS) that is used to eliminate nonkin bacteria (Weber et al., 2013). An essential requirement for conjugation and T6SS functioning requires a tight cell-to-cell contact, and for this reason, conjugation can only take place when the T6SS is repressed, otherwise, the receptors for conjugation will be killed. Weber et al. (2015) demonstrated that large *A. baumannii* conjugative plasmids, all belonging to LN_1, encode two proteins TetR1 and TetR2 that repress the expression of the T6SS system and in this way promoting the dissemination not only of LN_1 plasmids but also of those mobilizable plasmids that coexist with them (Weber et al., 2015; Di Venanzio et al., 2019). These observations explain why LN_1 plasmids are widely distributed along many *A. baumannii* strains.

Insertion Sequences

IS elements and transposons are mobile genetic elements that can move from one location to another on the same replicon or between replicons of the same cell, but if linked

pS32-1		MG954378.1	ATTTTGTGTCACACACCACGCATCTAACGATGACACCCTCAAAGCCTTACAGGATAAGGATTTTCAGCGATT
pAB5075	LN_2	NZ_JHUI01000005.1	ATTTTGTGTCACACACCACGCATCTAACGATGACACCCTCAAAGCCTTACAGGATAAGGATTTTCAGCGATT
pA85-2	LN_2	NZ_CP021786.1	ATTTTGTGTCACACACCACGCATCTAACGATGACACCCTCAAAGCCTTACAGGATAAGGATTTTCAGCGATT
pSSA12-2	LN_2	NZ_CP020576.1	ATTTTGTGTCACACACCACGCATCTAACGATGACACCCTCAAAGCCTTACAGGATAAGGATTTTCAGCGATT
unnamed2	LN_2	NZ_CP014217.1	ATTTTGTGTCACACACCACGCATCTAACGATGACACCCTCAAAGCCTTACAGGATAAGGATTTTCAGCGATT
pA1-1.	LN_2	NZ_CP010782.1	ATTTTGTGTCACACACCACGCATCTAACGATGACACCCTCAAAGCCTTACAGGATAAGGATTTTCAGCGATT
pAC29a	LN_2	NZ_CP008850.1	ATTTTGTGTCACACACCACGCATCTAACGATGACACCCTCAAAGCCTTACAGGATAAGGATTTTCAGCGATT
p2AB5075.	LN_2	NZ_CP008708.1	ATTTTGTGTCACACACCACGCATCTAACGATGACACCCTCAAAGCCTTACAGGATAAGGATTTTCAGCGATT
pPKAB07	LN_2	NZ_CP006964.1	ATTTTGTGTCACACACCACGCATCTAACGATGACACCCTCAAAGCCTTACAGGATAAGGATTTTCAGCGATT
pAB0057	LN_2	NZ_CM003909.1	ATTTTGTGTCACACACCACGCATCTAACGATGACACCCTCAAAGCCTTACAGGATAAGGATTTTCAGCGATT
unnamed1	LN_2	NZ_CM003741.1	ATTTTGTGTCACACACCACGCATCTAACGATGACACCCTCAAAGCCTTACAGGATAAGGATTTTCAGCGATT
pMRSN58-8.7	LN_2	NZ_CM003317.1	ATTTTGTGTCACACACCACGCATCTAACGATGACACCCTCAAAGCCTTACAGGATAAGGATTTTCAGCGATT
pMRSN7339-8.7	LN_2	NZ_CM003314.1	ATTTTGTGTCACACACCACGCATCTAACGATGACACCCTCAAAGCCTTACAGGATAAGGATTTTCAGCGATT
pABUH6a-8.8.	LN_2	NZ_AYEX01000118.1	ATTTTGTGTCACACACCACGCATCTAACGATGACACCCTCAAAGCCTTACAGGATAAGGATTTTCAGCGATT
pCanadaBC5-8.7	LN_2	NZ_AFDN01000003.1	ATTTTGTGTCACACACCACGCATCTAACGATGACACCCTCAAAGCCTTACAGGATAAGGATTTTCAGCGATT
p1ABST78.	LN_2	NZ_ABOZ01000236.1	ATTTTGTGTCACACACCACGCATCTAACGATGACACCCTCAAAGCCTTACAGGATAAGGATTTTCAGCGATT
p1BJAB0868	LN_2	NC_021730.1	ATTTTGTGTCACACACCACGCATCTAACGATGACACCCTCAAAGCCTTACAGGATAAGGATTTTCAGCGATT
p2ABAYE	LN_2	NC_010402.1	ATTTTGTGTCACACACCACGCATCTAACGATGACACCCTCAAAGCCTTACAGGATAAGGATTTTCAGCGATT
unnamed2	LN_2	CP014293.1	ATTTTGTGTCACACACCACGCATCTAACGATGACACCCTCAAAGCCTTACAGGATAAGGATTTTCAGCGATT
pAC30a	LN_2	CP007578.1	ATTTTGTGTCACACACCACGCATCTAACGATGACACCCTCAAAGCCTTACAGGATAAGGATTTTCAGCGATT
pAC12	LN_2	CP007550.1	ATTTTGTGTCACACACCACGCATCTAACGATGACACCCTCAAAGCCTTACAGGATAAGGATTTTCAGCGATT
p1ABTCD0715	LN_2	CP002523.1	ATTTTGTGTCACACACCACGCATCTAACGATGACACCCTCAAAGCCTTACAGGATAAGGATTTTCAGCGATT
p15A5_2.	LN_2	NZ_CP020575.1	GATTTTGTGTCACACACCACGCATCTAACGATGACACCCTCAAAGCCTTACAGGATAAGGATTTTCAGCGATT
pAB2.	LN_2	CP000523.1	ATTTTGTGTCACACACCACGCATCTAACGATGACACCCTCAAAGCCTTACAGGATAAGGATTTTCAGCGATT
p2ABST2.	LN_11	NZ_ABOY01000096.1	ATTTTGTGTCACACACCACGCATCTAACGATGACACCCTCAAAGCCTTACAGGATAAGGATTTTCAGCGATT
pAC1CU1.	LN_11	NC_010605.1	ATTTTGTGTCACACACCACGCATCTAACGATGACACCCTCAAAGCCTTACAGGATAAGGATTTTCAGCGATT
pCS01C	LN_13	NZ_HG977525.1	ATTTTGTGTCACACACCACGCATCTAACGATGACACCCTCAAAGCCTTACAGGATAAGGATTTTCAGCGATT
pNaval117-13.	LN_19	NZ_AFD001000021.1	ATTTTGTGTCACACACCACGCATCTAACGATGACACCCTCAAAGCCTTACAGGATAAGGATTTTCAGCGATT
pNaval181-13.	LN_19	NZ_AFD02000005.1	ATTTTGTGTCACACACCACGCATCTAACGATGACACCCTCAAAGCCTTACAGGATAAGGATTTTCAGCGATT
pAba3207a	LN_20	NZ_CP015365.1	ATTTTGTGTCACACACCACGCATCTAACGATGACACCCTCAAAGCCTTACAGGATAAGGATTTTCAGCGATT
pAba7835a	LN_20	NZ_CP033244.1	ATTTTGTGTCACACACCACGCATCTAACGATGACACCCTCAAAGCCTTACAGGATAAGGATTTTCAGCGATT
pAba3207a	LN_20	NZ_CP015365.1	ATTTTGTGTCACACACCACGCATCTAACGATGACACCCTCAAAGCCTTACAGGATAAGGATTTTCAGCGATT
unnamed2.	ORPH	NZ_CM003742.1	TTTTTGTGTCACACACCACGCATCTAACGATGACACCCTCAAAGCCTTACAGGATAAGGATTTTCAGCGATT
pD36-3.	ORPH	NZ_CP012955.1	ATTTTGTGTCACACACCACGCATCTAACGATGACACCCTCAAAGCCTTACAGGATAAGGATTTTCAGCGATT

FIGURE 4 | DNA sequence alignment of *oriT* regions (73 bp) located in *A. baumannii* plasmids. At the left, plasmid names followed by the plasmid lineages and by their accession numbers. Letters in red are the nucleotides that show differences with the *oriT* of plasmid pS32.1 (at the top).

to other mobile elements such as plasmids or phages, these elements can be horizontally transmitted to other genomes (Siguier et al., 2014). These elements play an essential role in genome plasticity and gene expression and play a crucial role in bacterial pathogens because antibiotic resistance genes are frequently linked to these elements (Partridge et al., 2018). However, 47.3% of the plasmids in our collection do not have IS elements. The remaining plasmids analyzed here have at least one IS element of the 41 different IS elements identified in the collection (Supplementary Table S6). The most common IS elements were *ISAbal* (13.1%) and *ISAbal25* (12.6%). The plasmid lineages exhibit contrasting features in terms of the number and diversity of IS elements: some plasmid lineages do not contain IS elements, such as LN_2 and LN_4. However, all the members of some lineages have IS elements. Some of these plasmids share the same IS elements or set of IS elements located in the same region (LN_10), while members of other lineages include different IS elements (i.e., LN_7). In conjunction, some lineages have members that lack IS elements; others have members with one IS; and the remaining include several IS elements of different kinds scattered along their DNA sequences. One of these lineages is LN_1. This lineage includes 42 members. Eight of these members do not possess IS elements; 22 members have only one element (the most frequent element being *ISAbal25*); and the remaining members have 2-4 IS elements. This observation clearly shows that IS elements are secondary acquisitions in the genomes of the members of this lineage. The plasmid lineages with a high number of IS

elements and which exhibit high diversity in IS families are LN_8 and LN_7.

XerCD Recombinase and *Pdif* Sites

XerCD recombinases and their action sites (*dif* or XerC/D and XerD/C sites) have an important role resolving chromosome and plasmid dimers to monomers, but also in other site-specific reactions like the integration of the phage CTX at the *dif1* site of *Vibrio cholerae* chromosome I (Summers and Sherratt, 1988; Val et al., 2005). The presence of homologous *dif* sequences (*pdif*) has been found in many *A. baumannii* plasmids and they consist of stretches of 28 bp that contain the binding sites for the XerC and XerD recombinases (11 bp each) separated by a variable 6 bp linker. It has been proposed that these sites play a role in the mobilization of discrete DNA modules between *A. baumannii* replicons (D'Andrea et al., 2009; Blackwell and Hall, 2017). These modules have an important role in the dissemination of antibiotic resistance genes, since some of them embrace antibiotic-resistant genes like OXA-58 and OXA-24/40 (Poirel and Nordmann, 2006; Merino et al., 2010; Grosso et al., 2012), genes involved in tetracycline resistance (*tet39*), or the *msrE* and *mphE* macrolide resistance genes (Blackwell and Hall, 2017). We evaluated the presence of these sites in our plasmid set using as query the *pdif* sites of plasmid pS30-1 described by Blackwell and Hall (2017). Many plasmids of our collection possess at least one XerC/D site and others, but not necessarily the same plasmids, have one or several XerD/C sites, but only 15 plasmids have

	XerC/D	XerC/D		
pS30-1**	ATTTCCGATAAGGGTGTATTATGTTAAAT	ATTTAACATAAATGAGCTTATACGAAA	KY617771.1	
pNaval18-8.4	ATTTCCGATAAGGGTGTATTATGTTAAAT	ATTTAACATAAATGAGCTTATACGAAA	AFDA02000008	Orph
pAB1	ATTTCCGATAAGGGTGTATTATGTTAAAT	ATTTAACATAAATGAGCTTATACGAAA	CP000522	Orph
pJABSDf	ATTTCCGATAAGGGTGTATTATGTTAAAT	ATTTAACATAAATGAGCTTATACGAAA	CP468232	Orph
p3ABAYE	ATTTCCGATAAGGGTGTATTATGTTAAAT	ATTTAACATAAATGAGCTTATACGAAA	CU468233	Orph
pOIFC143-6.2	ATTTCCGATAAGGGTGTATTATGTTAAAT	ATTTAACATAAATGAGCTTATACGAAA	NC_010404	Orph
pIS123-18	ATTTCCGATAAGGGTGTATTATGTTAAAT	ATTTAACATAAATGAGCTTATACGAAA	NZ_AFDL01000007	Orph
pABUH6b-10	ATTTCCGATAAGGGTGTATTATGTTAAAT	ATTTAACATAAATGAGCTTATACGAAA	NZ_ALI101000019	Orph
unnamed 2	ATTTCCGATAAGGGTGTATTATGTTAAAT	ATTTAACATAAATGAGCTTATACGAAA	NZ_AYF101000019	Orph
p2M3AC14-8	ATTTCCGATAAGGGTGTATTATGTTAAAT	ATTTAACATAAATGAGCTTATACGAAA	NZ_CM003742	Orph
pD36-3	ATTTCCGATAAGGGTGTATTATGTTAAAT	ATTTAACATAAATGAGCTTATACGAAA	NZ_CM004454	Orph
pD36-4	ATTTCCGATAAGGGTGTATTATGTTAAAT	ATTTAACATAAATGAGCTTATACGAAA	NZ_CM012955	Orph
unnamed	ATTTCCGATAAGGGTGTATTATGTTAAAT	ATTTAACATAAATGAGCTTATACGAAA	NZ_CM012956	Orph
pAF-401	ATTTCCGATAAGGGTGTATTATGTTAAAT	ATTTAACATAAATGAGCTTATACGAAA	NZ_CM015122	Orph
pBLAC1	ATTTCCGATAAGGGTGTATTATGTTAAAT	ATTTAACATAAATGAGCTTATACGAAA	NZ_CP018255	Orph
plasmid II	ATTTCCGATAAGGGTGTATTATGTTAAAT	ATTTAACATAAATGAGCTTATACGAAA	NZ_CP007713.	Orph
pLasmid 2	ATTTCCGATAAGGGTGTATTATGTTAAAT	ATTTAACATAAATGAGCTTATACGAAA	NZ_LNH65144	Orph
pBB300	ATTTCCGATAAGGGTGTATTATGTTAAAT	ATTTAACATAAATGAGCTTATACGAAA	NZ_L7594096	Orph
pAba9201a	ATTTCCGATAAGGGTGTATTATGTTAAAT	ATTTAACATAAATGAGCTTATACGAAA	NZ_CP021348	Orph
pAba10042a	ATTTCCGATAAGGGTGTATTATGTTAAAT	ATTTAACATAAATGAGCTTATACGAAA	CP023021	LN_6
pAba5845a	ATTTCCGATAAGGGTGTATTATGTTAAAT	ATTTAACATAAATGAGCTTATACGAAA	CP023027	LN_6
pAba10324b	ATTTCCGATAAGGGTGTATTATGTTAAAT	ATTTAACATAAATGAGCTTATACGAAA	CP023035	LN_6
pD127979	ATTTCCGATAAGGGTGTATTATGTTAAAT	ATTTAACATAAATGAGCTTATACGAAA	CP023024	LN_16
pAba7847a	ATTTCCGATAAGGGTGTATTATGTTAAAT	ATTTAACATAAATGAGCTTATACGAAA	NC_020525	LN_20
pAba3207a	ATTTCCGATAAGGGTGTATTATGTTAAAT	ATTTAACATAAATGAGCTTATACGAAA	CP023032	LN_20
			NZ_CP015365	LN_20
pABVA01*	ACTTCGGATAAGCCCATTTATGTTAAAT	AAATTAACATAAATA-ACGTTATACGAAA	FM210331	
p2ABAYE*	ACTTCGGATAAGCCCATTTATGTTAAAT	AAATTAACATAAATA-GCATTATACGAAA	NC_010402	LN_2
pAB0057*	ACTTCGGATAAGCCCATTTATGTTAAAT	AAATTAACATAAATA-GCATTATACGAAA	NC_011585	LN_2
pAB02*	ACTTCGGATAAGCCCATTTATGTTAAAT	AAATTAACATAAATA-GCATTATACGAAA	AY228470	
pAB2*	ACTTCGGATAAGCCCATTTATGTTAAAT	AAATTAACATAAATA-ACGTTATACGAAA	NC-009084	
pABIR*	ACTTCGGATAAGCCCATTTATGTTAAAT	AAATTAACATAAATA-GCATTATACGAAA	NC_010481	
pRCH52-1**	ATTTCCGATAAGGGTGTATTATGTTAAAT	ATTTAACATAAATGAGCTTATACGAAA	KT346360.1	
pAB118**	ATTTCCGATAAGGGTGTATTATGTTAAAT	ATTTAACATAAATGAGCTTATACGAAA	AMNC01000048	
pMNCU1***	ATTTCCGATAAGCCCATTTATGTTAAAT	AAATTAACATAAATGAGCTTATACGAAA	GQ342610.1	
pMHA2***	ACTTCGGATAAGCCCATTTATGTTAAAT	ATTTAACATAAATGAGCTTATACGAAA	GQ377752.1	

FIGURE 5 | Alignment of left *pdif* (XerC/D) and right *pdif* (XerC/D) plasmids sites (in red) and their flanking sequences. At the top sequences used as query. At the left, plasmid names followed by XerC/D and XerC/D sequences. Next, column list GenBank accession numbers followed by the lineage number. At the bottom and marked with asterisks are plasmid and *pdif* sites defined by other authors: D'Andrea et al. (2009); Merino et al. (2010), and Blackwell and Hall (2017).

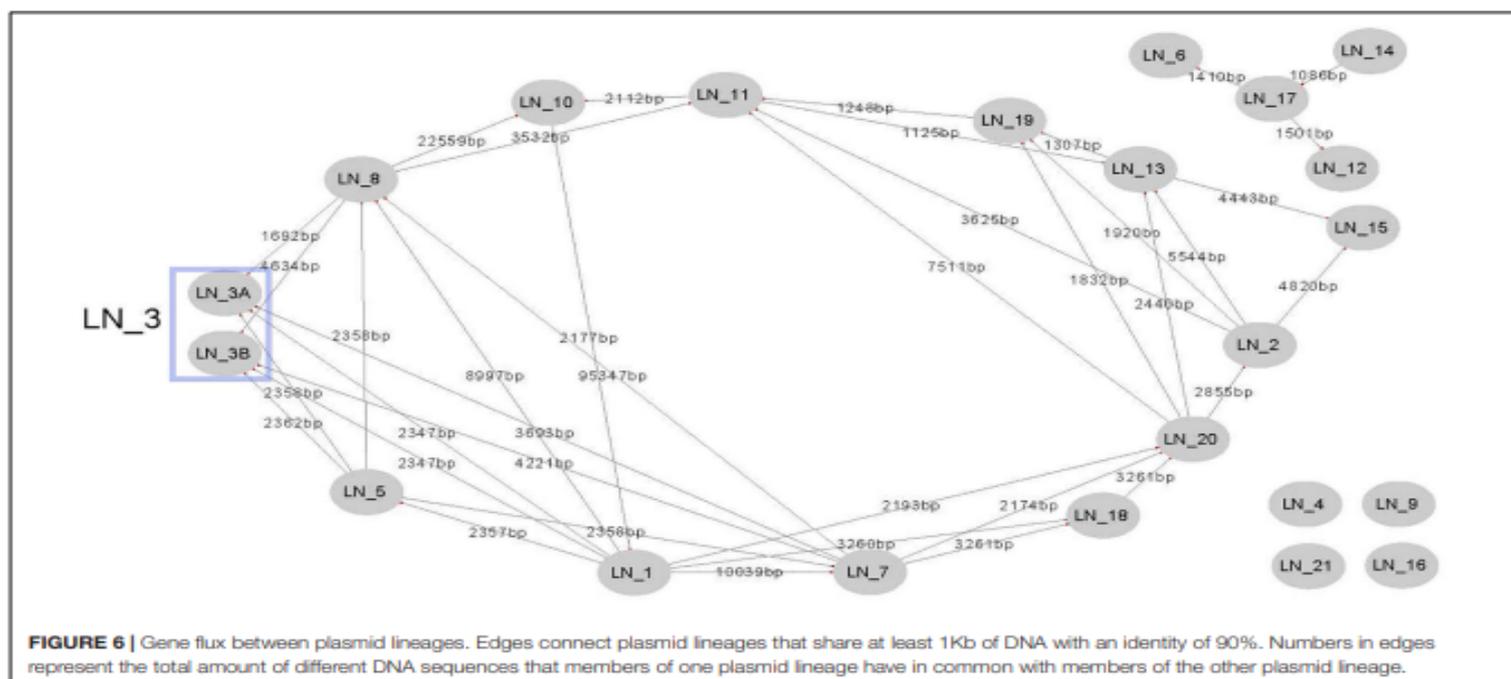
matches with both sequences. The list of the plasmids possessing these sites and the DNA sequence alignment of these sites are shown in Figure 5. In this work, we analyzed the *pdif* modules with antibiotic resistance genes. This analysis revealed some of the gene modules described by other authors in new plasmids. For example, the module of plasmid pS30-1 carrying *tetR* and *tet39* genes and involved in tetracycline resistance is also present in the orphan plasmid pNaval18-8.4 (Blackwell and Hall, 2017). However, in plasmids of the Mexican isolates, we found two new *pdif* modules. One of them of 967bp contains an OXA-72 gene and was identified in the members of LN_6. The second was present in plasmids pAba7847a and pAba3207a of LN_20 and consists in a 5260 bp module with four genes: OXA-58, two IS30 family transposases, and a hypothetical protein. However, more work must be done to identify other *pdif* modules carrying genes not related to antibiotic resistance.

Which Plasmids Carry Antibiotic Resistance Genes?

As vehicles of horizontal gene transfer, plasmids play a crucial role in the dissemination of antibiotic resistance genes within pathogenic bacterial populations (San Millan, 2018; Carattoli, 2013). To evaluate the role of *A. baumannii* plasmids in the dispersion of antibiotic resistance genes, we searched for the presence of acquired resistance genes in our plasmid set using the ResFinder database (Zankari et al., 2012). In this manner, we identified not only plasmids that carry antibiotic resistance genes but also the plasmids lineages associated with these genes (Supplementary Table S7). Only 35.2% of our plasmid collection possesses antibiotic resistance genes, and of these

plasmids, thirty-eight contain only one antibiotic resistance gene. Fifteen plasmids have two antibiotic resistance genes, and eight plasmids have three or more of these genes. The most frequent antibiotic resistance genes were those involved in resistance to aminoglycosides, which were present in 60.6% of the plasmids carrying antibiotic resistance, followed by plasmids with genes conferring resistance to beta-lactam antibiotics (49.1%). Sulfonamide resistance genes were also present in 26.2% of the plasmids with antibiotic resistance, and 14.7% have genes implicated in macrolide resistance.

Of the twenty-three plasmid lineages, only thirteen have members with antibiotic resistance genes. However, most commonly, only a few members of a plasmid lineage possess this type of gene, suggesting that these genes were secondary acquisitions after the origination of the lineage. With a few exceptions, antibiotic resistance genes are closely linked to one or two IS elements, in some cases to class 1 integrons, and in three plasmids, namely, pA85-3, pAB04-2 and pUSA15-1, all of which are members of LN_1, the antibiotic resistance genes are linked to an AbaR4 element (Hamidian et al., 2014; Hamidian and Hall, 2018b). A good example of this situation is lineage LN_1. This lineage has 42 members, but only 14 have antibiotic resistance genes, and of these plasmids, nine carry one antibiotic resistance gene; three plasmids have two resistance genes; and plasmid p1AB5075 carries eleven of these genes. One gene is an aminoglycoside resistance gene (*aph(3')*-*Via*) surrounded by two IS*Aba25* elements, and the remaining antibiotic resistance genes are class 1 integrons. The other twelve plasmids have antibiotic resistance genes tightly linked to IS*Aba1* or IS*Aba25* elements. These observations suggest that the IS elements and



antibiotic resistance genes were acquired after the origin of this plasmid lineage.

The most predominant mechanism for carbapenem resistance in *A. baumannii* is the activity of OXA-type beta-lactamases (serine carbapenemases), some of which are encoded in plasmids (Da Silva and Domingues, 2016). In the analyzed plasmids, we found seven lineages with members carrying *bla*OXA genes: seven members of LN_1 carry *bla*OXA-23 genes as well as two members of LN_5. The four members of LN_6, all obtained from Mexican isolates, have *bla*OXA-72 genes. All members of LN_11 and LN_21 possess *bla*OXA-58 genes, and one member of LN_14 and another from LN_17 contain *bla*OXA-24 genes.

Gene Flux Between Plasmid Lineages

To evaluate the gene flux between plasmid lineages or the amount of gene information that is shared between plasmid lineages, we performed BLASTn comparisons using the representative plasmid of one lineage as a query against all plasmids belonging to the other lineages. With this approach, we identified all DNA regions of 1 kb or higher with an identity of at least 90% and recorded the genes that remained in such regions. The results of this analysis are summarized in **Supplementary Table S8**. The amount of sequence information that two plasmid lineages can share varies dramatically (**Figure 6**). As described above, the lineage pair LN_7 and LN_8 share at least 90% sequence identity and coverage higher than 50% but lower than 85%. In contrast, lineages LN_4, LN_9, LN_16 and LN_21 do not share DNA sequences higher than 1 kb with any other plasmid lineage. Interestingly, plasmid members of these lineages are embedded in different genomic backgrounds, as illustrated in the phylogenetic tree shown in **Figure 7**. The remaining lineages

share information with at least three and up to seven other plasmid lineages (**Supplementary Table S8**). Most of the DNA sequences that are shared between plasmid lineages, as expected, contain transposable elements, commonly but not exclusively *IS**Aba1* and *IS**Aba125*. Sets of antibiotic resistance genes are also frequently shared between plasmid lineages, and these genes are frequently linked to transposable elements such as *IS* elements and antibiotic resistance islands (*AbaR4*), suggesting that these elements frequently travel together (**Supplementary Table S6**).

Beyond *A. baumannii* and *Acinetobacter*

It has been shown that plasmids play a crucial role in disseminating virulence and antibiotic resistance genes in pathogenic bacteria. However, not all plasmids have the same potential to act as vectors for these purposes. One property that imposes limits on this potential is the replication host range. Some plasmids are capable of replicating in one or a few related species (narrow host range), while others are capable of replicating in an ample range of species and even genera (wide host range) (Jain and Srivastava, 2013). To evaluate the potential plasmid host ranges of the different *A. baumannii* plasmid lineages, we follow two strategies: first, we explored the NCBI nr (nonredundant) database by BLASTp analysis. We searched for proteins identical in sequence to those annotated as Rep proteins in our plasmid collection but excluded those identified in *A. baumannii* or *Acinetobacter*. Second, we also performed a BLASTn analysis of the NCBI nr (nonredundant) database, using the DNA sequences of the representative plasmids of each lineage and all orphan plasmids as queries but, again, excluding matches within *A. baumannii* or within the *Acinetobacter* genus.

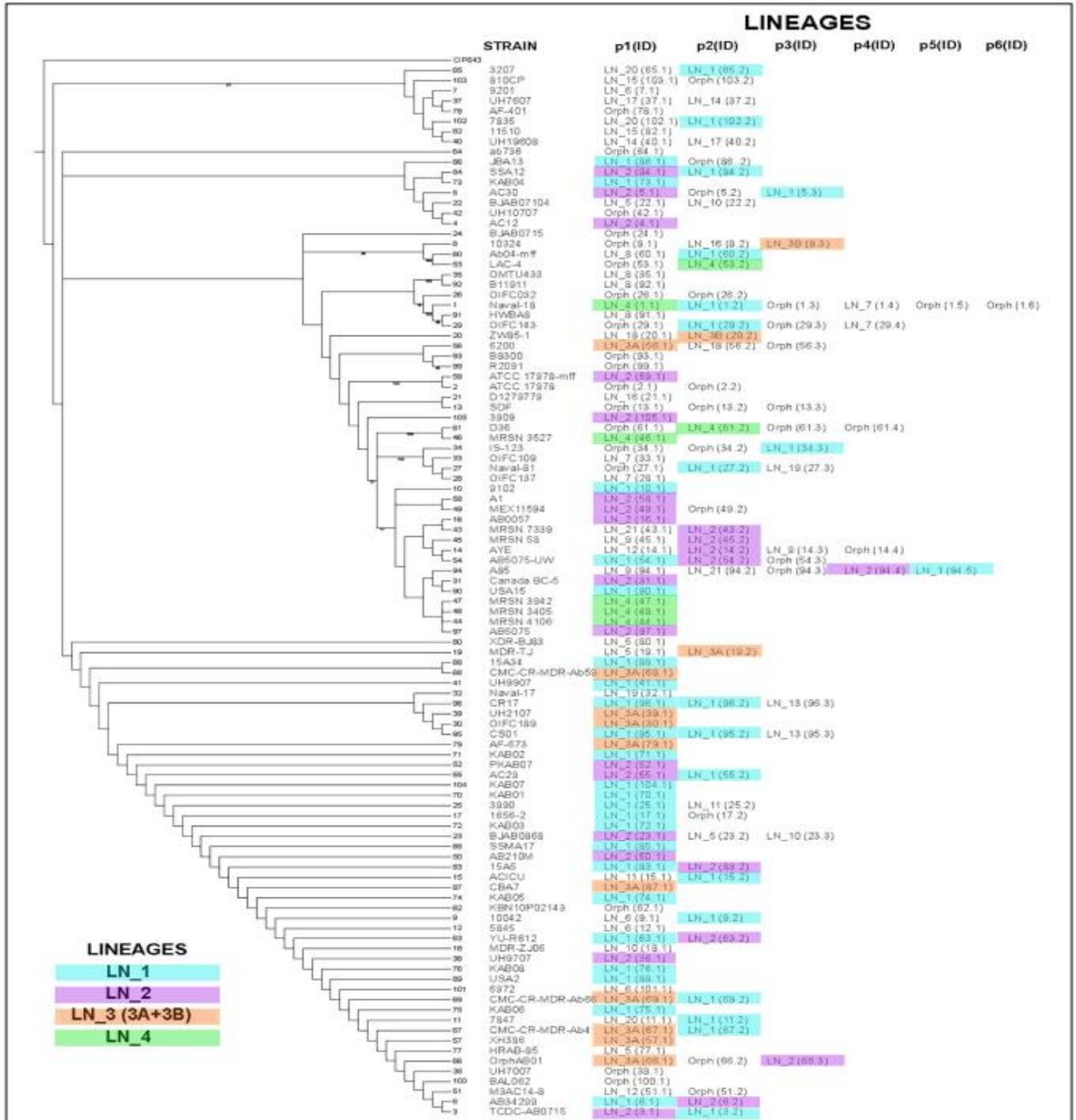


FIGURE 7 | Phylogenetic Tree of strains carrying the plasmids analyzed here. The tree was constructed using unicopy ribosomal protein genes without recombination signals. Bootstrap values higher than 70% are indicated in the tree. Strains containing our plasmid collection harbors a different numbers of plasmids, between one and six (p1..p6). At the right of each strain name shows the plasmids that that particular strain contains, using the alias plasmid name listed in **Supplementary Table S1** and the plasmid lineage that they belong. Plasmids marked in color belong to LN_1, LN_2, LN_3 or LN_4. Orph, indicates that the plasmid is an orphan.

A summary of our findings is presented in **Supplementary Table S9**. The Rep protein that seems to have a broad host range is encoded in the orphan plasmid pAB3 and can be found in the genomes of twelve genera of Gammaproteobacteria, ten genera of Betaproteobacteria, and three genera of Alphaproteobacteria and even in the actinobacterial species *Mycobacteroides abscessus*. This protein belongs to the RepC family. Some replication proteins of the GR3 homology group are also found in a wide variety of bacteria. For example, Rep proteins of the plasmids pB11911 (LN_8) and pMDR-ZJ06 (LN_10) were also identified in twelve different genera, all within Gammaproteobacteria. Similarly, the GR3 Rep protein of the orphan plasmid pHWBA8_1 was also found in the genomes of ten different genera of Gammaproteobacteria. Some Rep proteins of homology group GR2 were identified in, in addition to *A. baumannii*, *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae* and *Providencia rettgeri*. Some other Rep proteins were identified outside of Gammaproteobacteria; for example, some Rep proteins of LN_12 (GR11) and LN_14 (GR27) were located in *Neisseria meningitidis* (Betaproteobacteria). Additionally, the Rep protein of the orphan plasmid pIS123-12 (GR20) was present in the betaproteobacterial species *Nakamurella silvestris*. The remaining Rep proteins of the other GR groups seem to have a limited host range, being found in only *Acinetobacter*.

Intriguingly, some plasmids in our collection are very similar to other plasmids that are not closely related to *Acinetobacter*. For example, pMDR-ZJ06, which is the representative plasmid of LN_10, shares $\geq 75\%$ coverage and 99% DNA sequence identity with the plasmid pEA49-KPC (GenBank: KU318419.1) of *Enterobacter aerogenes*, the plasmid RCS40_p (GenBank: LT985241.1) of *E. coli*, the plasmid pPMK1-NDM (GenBank: NZ_CP008933.1) of *K. pneumoniae* and the plasmid unnamed1 of *Citrobacter* sp. Similarly, plasmid pKP-NCGM38-1 (GenBank: AB825955.1) of *K. pneumoniae* shares 86% coverage and 99% identity with the representative plasmid of LN_13, indicating that this plasmid belongs to LN_13. The representative plasmid of LN_18 is almost identical to the plasmid p3SP-NDM (GenBank: KP900015.1) of *E. aerogenes* strain p3SP and shares 75% coverage and 99% identity with the plasmid p06-1619-NDM (GenBank: KX832928.1) of *P. rettgeri*.

The smallest plasmid in our collection, the orphan plasmid pJBA13_2 (1,109 bp), is almost identical to other very small plasmids belonging to other bacterial classes. This plasmid shares 100% coverage and 100% identity with an unnamed plasmid (GenBank: NZ_CP021055.1) from *Methylobacterium zatmanii* strain PSBB041 and with the plasmid unnamed6 (GenBank: NZ_CP023042.1) from *Komagataeibacter saccharivorans* CV1, both belonging to Alphaproteobacteria. Additionally, with plasmid unnamed2 (GenBank: NZ_CP013938.1) from *Weissella cibaria* strain CMU (Firmicutes) and with unnamed plasmid2 (GenBank: NZ_CP021993.1) from *Cryobacterium* sp. LW097 (Actinobacteria). Finally, orphan plasmid pJBA13_2 is almost identical to plasmids from *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Kentucky str. SA20030505 (GenBank: NZ_CP022501.1), *Pantoea ananatis* strain YJ76 (GenBank: NZ_CP022430.1) and *E. coli* strain HB-Coli0 (GenBank: NZ_CP020935.1) (Gammaproteobacteria). These observations indicate that the

A. baumannii plasmid replication systems vary widely in host range; some seem to replicate only in *Acinetobacter* species, while others are capable of replicating in bacteria of different families and even different bacterial classes.

Pandemic and Epidemic Plasmids

We took two different approaches to evaluate whether our plasmid lineages are pandemic, that is, capable of existing in a wide range of chromosomal backgrounds, or epidemic, that is, only found in a few closely related chromosomes. For this purpose, we first determined the number of STs (Oxford and Pasteur MLST schemes) containing members of a specific plasmid lineage (listed in **Supplementary Table S1**). We found that a majority of our plasmid lineages occurred in more than one ST. Moreover, most of the plasmid lineages are present not only in isolates belonging to the International Clones but also out of these clonal complexes. For example, members of LN_1 are present in 20 different STs, and members of LN_2 are present in 9 STs. These lineages are clearly pandemic; however, members of some plasmid lineages seem to be epidemic, considering that these plasmids are restricted to a few STs; for instance, LN_3A, possessing 11 members, is represented in only 3 STs, mostly in ST208, and members of LN_4 are located in 3 STs. Lineages LN_9, LN_11, LN_14, LN_15, and LN_17 are present in one ST, but these lineages have only two or three members each, and in these circumstances, it is not possible to determine whether these lineages have a restricted chromosomal range.

Our second approach was to construct a phylogenetic tree using single-copy ribosomal genes without recombination signals of the strains including our plasmid collection and map the different plasmid lineages in this tree. In **Figure 5** we show the locations in the tree of our entire plasmid set, indicating the corresponding plasmid lineages. In **Figure 5**, we show evidence that the members of the four largest lineages (LN_1 to LN_4) are scattered throughout the phylogenetic tree, indicating that these plasmids are capable of replicating in a wide range of chromosomal backgrounds that are not necessarily closely related. However, notably, despite the wide distribution of plasmids belonging to LN_2 and LN_3A, these plasmids do not possess genes annotated as part of the conjugation or mobilization machineries. Nevertheless, as mentioned above, all members of LN_2 have *oriT*-like sequences that probably can be used for mobilization when they co-reside with a compatible conjugative helper plasmid.

Our bioinformatics analyses suggest that *A. baumannii* plasmids have diverse host ranges: plasmid lineages containing a Rep protein of homology group GR3, have the potential to replicate in an extensive range of bacterial genera, including some important pathogens such as *K. pneumoniae*, *E. coli*, and *Salmonella enterica*. As described above, the representative plasmid of LN_10 is very similar in sequence and gene content to previously described plasmids of *E. aerogenes*, *E. coli* and *K. pneumoniae*. All these plasmids of presumably of very wide host ranges are located in not closely related clades in the phylogenetic tree, suggesting that these plasmids were introduced into the *A. baumannii* populations in different independent

events. The remaining plasmids seem to replicate only within *Acinetobacter* (restricted host range).

A notable feature that we want to point out is the behavior of plasmids as antibiotic resistance gene carriers: members of lineages LN_4, LN_6, LN_7, LN_8, LN_10, LN_11, LN_3B, LN_18 and LN_20 all carry antibiotic resistance genes. As mentioned above, lineages LN_8 and LN_10 can probably also replicate in *K. pneumoniae*, a pathogen that has been identified as an important reservoir of antibiotic resistance genes (Wyres and Holt, 2018). In contrast, lineages LN_2, LN_3A, LN_12, LN_13, LN_15, LN_16A, LN_19, and LN_21 do not carry genes of this type. We also found plasmids with intermediate behavior, in which some members of the lineage carry antibiotic resistance genes, while others do not (LN_1, LN_5, LN_14 and LN_17). At least in LN_1 and LN_5, antibiotic resistant genes are closely linked with IS elements.

Evolution of *A. baumannii* Plasmids in the Nosocomial Environment

Considering all these observations as a whole, we want to propose the following hypothesis to explain the evolution of *A. baumannii* plasmids in the nosocomial environment: before the advent of antibiotics, *A. baumannii* plasmids were parasites of this organism. The gene of these plasmids were involved not only in maintenance functions but also in reducing the fitness cost of plasmid replication. The stability of the structure and gene content of these plasmids over long periods of time in several genetic backgrounds within each of plasmid lineage is probably a product of this condition. When *A. baumannii* arrived in the nosocomial environment, this species began to interact with other bacterial pathogens, such as *K. pneumoniae* or *E. coli*, which already contained plasmids with antibiotic resistance genes. At this point, *A. baumannii* acquired a subset of these plasmids with broad host ranges, probably containing Rep proteins of the homology group GR3. The coexistence of these broad-host-range plasmids with the *A. baumannii* genome allowed the dispersion of new transposable elements with or without antibiotic resistance genes. The acquisition of IS elements permitted some plasticity in *A. baumannii* plasmids. In other words, we propose that at the beginning, *A. baumannii* plasmids were specialized to replicate in this microorganism with a minimal fitness cost, but the acquisition of new broad-host-range plasmids that already contained antibiotic resistance genes native to other microbial pathogens allowed *A. baumannii* to survive easily in the nosocomial environment and become a pathogen of concern.

A Note Regarding Plasmid Nomenclature

During this study, we found that the nomenclature of *Acinetobacter* plasmids does not follow any type of rule. Moreover, adding an additional layer of complexity, some plasmids do not have official names and are simply referred to in GenBank as unnamed plasmids or tagged as p1, p2, etc. This evident lack of convention imposes unnecessary challenges during a systematic study of plasmids. We need names that easily link a plasmid with its strain/isolate ID and with the species name.

For these reasons, we strongly suggest naming *Acinetobacter* plasmids by following the nomenclature rules proposed for the *Agrobacterium* and *Rhizobium* cryptic plasmids: first, all plasmid names must begin with letter “p” followed by the first letter of the genus name and the first two letters of the species name. Then, the strain/isolate ID number is added, followed by a lower-case letter, using “a” for the smallest plasmid, “b” for the next plasmid and so on. For example, the name of the smallest plasmid of *A. haemolyticus* MC1956 would be pAhaMC1956a. The plasmid that is next in size in the same strain will be pAhaMC1956b, and so on.

The annotation of plasmid genes is also confusing and not uniform, and genes are often annotated by using the name of the best BLAST hit and not the true biological function of the gene in the plasmid. Recently, Christopher M. Thomas and coworkers published a paper addressing all these problems and suggested methods to resolve these issues. We encourage scientists interested in plasmid biology to follow those recommendations (Thomas et al., 2017).

CONCLUSION

Acinetobacter baumannii plasmids belong to a limited number of plasmid lineages and their structure seem to be very stable, in contrast to the observations made in the so-called mosaic plasmids. Mosaic plasmids are composed of genetic elements from distinct sources and they are highly dynamic in acquisition and loss of genes (Pesesky et al., 2019).

Core genomes of *A. baumannii* plasmid lineages contain more genes to those required for plasmid maintenance functions and these genes seem to be not related to the nosocomial environment, open the possibility that they could have other functions and opening the possibility that they reduce fitness cost in the plasmid host. Evidence showed here, suggest that each plasmid lineage represents a plasmid incompatibility group and that the largest plasmid lineages are widely distributed along the phylogenetic tree even though, some of them lack identifiable mobilization systems. In most plasmid lineages transposable elements and antibiotic resistance genes are secondary acquisitions. Plasmids of broad host range have a crucial role in the acquisition of antibiotic resistance genes in *A. baumannii*.

MATERIALS AND METHODS

Plasmid Collection

Our collection included all the complete plasmids (with the “assembled molecule” status) of *A. baumannii* available in the RefSeq and GenBank databases (NCBI) on August 14th, 2017. We parsed the GenBank and fasta files with the SeqIO Biopython module (Cock et al., 2009) in Python 2.7 for all subsequent analyses.

To increase the diversity of our plasmid collection, we obtained the complete genome sequences of 10 Mexican isolates using the PacBio RSII and Illumina NextSeq platforms.

The genome sequences of three isolates, namely, 7804, 810CP and 3207, have previously been reported by some of the authors of this manuscript (Castro-Jaimes et al., 2016; Pérez-Oseguera et al., 2017).

For the other eight isolates, we constructed hybrid assemblies with reads from both platforms using SPAdes v3.9.0 or Unicycler v0.4.1 (Bankevich et al., 2012; Wick et al., 2017). We performed functional annotation with the NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline. The GenBank accession numbers of the genomes of the Mexican isolates are listed in **Supplementary Table S10**. Therefore, in total, we analyzed 173 complete plasmids, and the complete list of plasmids and strains is shown in **Supplementary Table S1**.

Plasmid Lineage Delimitation

We performed paired BLASTn (Camacho et al., 2009) searches between all 173 complete plasmids in our collection. We built different plasmid networks, each based on a defined range of coverage (from 40 to 90%). For each plasmid pair, we placed a link between the plasmids if the smallest plasmid covered at least a defined percentage of the other plasmid, where coverage was determined by the sum of alignment lengths with greater than 90% identity. Then, we extracted the islands or “connected components” with NetworkX (Hagberg et al., 2008) in Python 2.7. For each connected component, we extracted the most connected plasmid (hub) to use as a reference. When there was more than one hub, we sorted the hubs by size and selected the largest plasmid. The plasmid lineages and the associated references are listed in **Supplementary Table S1**.

Extraction of Plasmid Replication Proteins

We used an annotation-based approach to extract the plasmid initiation replication proteins. By using the plasmid GenBank files, we performed a case-insensitive search for the following keywords in the products: “replication protein”, “plasmid replication initiator”, “plasmid replication”, “DNA replication”, “plasmid replicase”, “replication a”, “replication b”, “replication c”, “RepB”, “rolling circle”, “replication initiation”, “replicase”. Then, we extracted both the nucleotide and protein sequences and excluded partial genes and pseudogenes. Additionally, we extracted 500 nucleotides upstream and downstream of the Rep gene for further analyses. This entire process was performed with Python 2.7 and the Biopython SeqIO module (Cock et al., 2009).

Reference Proteins for Homology Group Designation

We compiled all replication (Rep) proteins that were reported by Bertini et al. (2010); (Bertini et al., 2010) by gene name, plasmid name and plasmid accession number when available. For those cases in which the Rep proteins did not have a locus tag or gene name, we added an artificial locus tag built using the replicon ID and the replicase name. When the replicase name was not available, we assigned the word ‘rep’ followed by a number in the order of appearance in the GenBank file to distinguish between replicases. In some cases, when there were two replication

proteins in the same plasmid, to correctly assign these proteins as references for certain homology groups, we performed a BLAST search of these proteins against the GenBank nr database to identify corresponding hits outside the *Acinetobacter* genus reported in **Supplementary Table S1** in Bertini et al. (2010). Two proteins could not be identified: the Aci3 replicase from plasmid Ab599 (member of GR3), because the plasmid sequence was not deposited in databases, and the Aci2 replicase from the MAD plasmid, because the plasmid had a partial sequence that did not include the replicase. Therefore, we omitted these proteins from our analyses and examined other members of the same homology groups instead. As reported by Lean and Yeo (2017), the GR2 homology group should be split into two groups; therefore, we separated the proteins that represent GR2 from those of the newly formed GR20. Additionally, (Cameranesi et al., 2017) recently reported new homology groups; thus, we downloaded the plasmids that harbored the replicases that represent these groups and extracted those genes. **Supplementary Table S2** lists all proteins used as references in this work, including the origins, accessions, numbers and headers used in the multi-FASTA files included in **Supplementary Materials S1, S2**.

Homology Group Assignment for Rep Proteins

First, we performed paired BLASTn (Camacho et al., 2009) searches between all genes encoding replication initiation proteins present in our plasmid collection. We retained hits with more than 74% nucleotide identity and that covered at least 90% of the query. Then, if the query coding sequence (CDS) mapped to only one homology group, we designated the sequence as belonging to that group, whereas if there was more than one hit for different homology groups, we assigned the query to the GR with the highest percentage identity. We discarded the GR23 homology group because the associated reference (KY984047_repAci23) was 100% identical to one of the references of GR8 (GU979000.1_p11921_repA).

Plasmid Rep Protein Phylogenetic Analysis and Designation of New Homology Groups

We built a network in which each gene encoding a Rep protein was connected to another if the two genes shared at least 74% nucleotide identity and 90% coverage. Then, for the islands or connected components that did not have a Rep protein in the reference table, we selected the hub as a reference and added it to **Supplementary Table S1**. Additionally, we built plasmid replication initiation protein phylogenies to validate current assignments and new homology groups. We searched for the associated Pfam domains in the Pfam database (El-Gebali et al., 2019), accessed on February 21st, 2018, to separate the proteins by conserved domains and perform alignments separately because these proteins are very different. We used Clustal Omega (Sievers et al., 2014) to align amino acids and RevTrans (Wernersson and Pedersen, 2003) to guide the nucleotide alignment by the translated CDS. Then, we ran jModelTest2 (Darriba et al., 2012) to search for an adequate evolutionary model and built the

phylogenetic tree with PHYML (Guindon and Gascuel, 2003) with the selected model. By visual inspection, we validated the references of new homology groups, selected proteins that may be representative of new clades and designated these proteins as new homology groups, as detailed in **Supplementary Table S2**.

Phylogenetic Analysis of Ribosomal Proteins and MLST

We used Roary (Page et al., 2015) to extract monocopy genes encoding ribosomal proteins belonging to the core genome and that had the exact same size in all the strains to avoid gaps in the alignment. We aligned the ribosomal proteins with Clustal Omega (Sievers et al., 2014) to guide the nucleotide alignment with RevTrans (Wernersson and Pedersen, 2003). We discarded sequences with recombination signals detected with RDP4 (Martin et al., 2015). We concatenated the remaining nucleotide alignments with FASconCAT-G (Kück and Longo, 2014) and used jModelTest2 (Darriba et al., 2012) to select the evolutionary model to build a phylogenetic tree with PHYML (Guindon and Gascuel, 2003). We used the ribosomal proteins of the *Acinetobacter haemolyticus* CIP 64.3 strain as an outgroup. The sequence type (ST) assignment of each *A. baumannii* isolate, under Oxford and Pasteur MLST schemes, were obtained from the PubMLST database¹ (Bartual et al., 2005; Diancourt et al., 2010).

Identification of Secretion Systems, Antibiotic Resistance Genes, and Insertion Sequences on Plasmids

We used MacSyFinder with the TXSSCAN profiles (Abby and Rocha, 2017) to identify secretion systems on the plasmid collection and ResFinder to identify the acquired antibiotic resistance genes present in our plasmid set (Zankari et al., 2012). We identified the insertion sequence (IS) elements present in the plasmids using the ISfinder database at² (Siguier et al., 2006).

Identification of *pdif* Sites (XerC/D and Xer D/C) on Plasmids

To identify the *pdif* sites in our plasmid set, we made a BLASTn analysis using as queries the *pdif* sites of plasmid pS30-1: XerC/D, ATTTTCGTATAAGGTGTATTAT- GTTAATT and XerD/C, ATTTAACATAATGGCTGTTATGCGAAAC (Blackwell and Hall, 2017).

COG Assignments

We determined homologous gene assignments for each plasmid based on hidden Markov model (HMM) searches using the *hmmsearch* program (Eddy, 2011). This HMM search process employs a previously constructed model set that represents each of the 4873 COGs and 8539 Remained Orthologous Groups (ROGs) (Tatusov et al., 2003; Taboada et al., 2010). Then, using Perl scripts, we classified each assigned COG by using the general classification scheme of Tatusov [66]. We calculated the

frequency of each gene per class and plotted the results using ggplot2 R scripts³ (Wickham, 2009).

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Genome sequences were deposited in NCBI/GenBank with the following accession numbers: Isolate 7847: NZ_CP023031.1, CP023032.1, CP023033.1. Isolate 7835: CP033243.1, CP033244.1, CP033245.1. Isolate 9102: CP023029.1, CP023030.1. Isolate 5845: NZ_CP023034.1, CP023035.1. Isolate 10042: NZ_CP023026.1, CP023027.1, CP023028.1. Isolate 10324: NZ_CP023022.1, CP023023.1, CP023024.1, CP023025.1. Isolate 9201: NZ_CP023020.1, CP023021.1.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MC conceived, designed, and coordinated the study. ÁP-O made plasmid profile analysis and genome analysis of Mexican isolates. AS-C and SC-J made genome assemblies, genome annotation, network analysis, and bioinformatics analysis, and made bioinformatic analysis. AS-C designed figures and most of the tables of the manuscript. R-MG-R made COG analysis and statistics. LA-P made the analysis of Rep proteins. LL made bioinformatic analysis and made many pf Perl scripts used in this work. PV contributed with the Mexican isolates, participated in the manuscript drafting and in the general discussion. SC-R and JS-S had a crucial role in the general discussion. All authors contributed to manuscript revision, read and approved the submitted version.

FUNDING

This work was partially supported by PAPIIT grant number 200318 (Universidad Nacional Autónoma de México) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) grant number 253070.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Ricardo Grande and Gloria Tanahiry Vazquez Castro for the sequencing support as part of the *Unidad de Secuenciación Masiva y Bioinformática* (UNAM). AS-C made his Ph.D. studies in Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM) and was supported by CONACyT with a scholarship (244044).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.01283/full#supplementary-material>

¹<https://pubmlst.org>

²<http://www-is.biotoul.fr>

³<http://www.R-project.org/>

FIGURE S1 | Plasmid networks.

FIGURE S2 | Circular maps of members of plasmid lineage LN_3.

FIGURE S3 | Circular maps of members of plasmid lineages LN_4 and LN_5.

FIGURE S4 | Circular maps of members of plasmid lineages LN_6 and LN_7.

FIGURE S5 | Circular maps of members of plasmid lineage LN_8.

FIGURE S6 | Circular maps of members of plasmid lineages LN_9, LN_10.

FIGURE S7 | Maps of members of plasmid LN_11 and LN_12.

FIGURE S8 | Linear maps of members of plasmid lineages LN_13, and LN_14.

FIGURE S9 | Linear maps of members of plasmid lineages LN_15, and LN_16.

Figure S10 | Maps of members of plasmid lineages LN_17 and LN_18.

FIGURE S11 | Linear maps of members of plasmid lineages LN_19, and LN_20.

FIGURE S12 | Linear maps of members of plasmid lineage LN_21.

FIGURE S13 | Phylogenetic tree of Rep proteins belonging to the Pri_CT family.

FIGURE S14 | Phylogenetic Tree of strains carrying the plasmids analyzed here and their associated Toxin-Antitoxin modules.

TABLE S1 | List of plasmids belonging to lineages and their general characteristics.

TABLE S2 | Replicases used to assign GR homology groups.

TABLE S3 | Replicon-associated iterons identified in new GR members.

TABLE S4 | Plasmids encoding two or more replication proteins.

TABLE S5 | Conjugation genes and Toxin-Antitoxin system present in plasmids.

TABLE S6 | IS elements present in plasmids.

TABLE S7 | Antibiotic resistance genes located in plasmids.

TABLE S8 | Gene flux between plasmid lineages.

TABLE S9 | Replication proteins of *A. baumannii* plasmids which are identical in sequence to replication proteins in the genomes of other *Acinetobacter* species and in other genera.

TABLE S10 | GenBank accession numbers of Mexican isolates and their Sequence type following Oxford and Pasteur schemes.

MATERIAL S1 | List in fasta format of genes encoding representative replication proteins of each one of the GR homology groups.

MATERIAL S2 | List in fasta format of the representative replication proteins of each one of the GR homology groups.

REFERENCES

- Abby, S. S., and Rocha, E. P. C. (2017). Identification of protein secretion systems in bacterial genomes using MacSyFinder. *Methods Mol. Biol.* 1615, 1–21. doi: 10.1007/978-1-4939-7033-9_1
- Antunes, L. C. S., Visca, P., and Towner, K. J. (2014). *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. *Pathog. Dis.* 71, 292–301. doi: 10.1111/2049-632X.12125
- Armalytė, J., Jurėnas, D., Krasauskas, R., Čepauskas, A., and Sužiedėlienė, E. (2018). The higBA toxin-antitoxin module from the opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii* - regulation, activity, and evolution. *Front. Microbiol.* 9:732. doi: 10.3389/fmicb.2018.00732
- Austin, S., and Nordström, K. (1990). Partition-mediated incompatibility of bacterial plasmids. *Cell* 60, 351–354. doi: 10.1016/0092-8674(90)90584-2
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., et al. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 19, 455–477. doi: 10.1089/cmb.2012.0021
- Bartual, S. G., Seifert, H., Hippler, C., Luzon, M. A. D., Wisplinghoff, H., and Rodríguez-Valera, F. (2005). Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* 43, 4382–4390. doi: 10.1128/JCM.43.9.4382-4390.2005
- Baxter, J. C., and Funnell, B. E. (2014). Plasmid partition mechanisms. *Microbiol. Spectr.* 2:6. doi: 10.1128/microbiolspec.PLAS-0023-2014
- Bertini, A., Poirel, L., Mugnier, P. D., Villa, L., Nordmann, P., and Carattoli, A. (2010). Characterization and PCR-based replicon typing of resistance plasmids in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 4168–4177. doi: 10.1128/AAC.00542-10
- Bignell, C., and Thomas, C. M. (2001). The bacterial ParA-ParB partitioning proteins. *J. Biotechnol.* 91, 1–34. doi: 10.1016/S0168-1656(01)00293-0
- Blackwell, G. A., and Hall, R. M. (2017). The tet39 determinant and the msrE-mphE genes in *Acinetobacter* plasmids are each part of discrete modules flanked by inversely oriented pdif (XerC-XerD) sites. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61:e00780-17. doi: 10.1128/AAC.00780-17
- Blackwell, G. A., and Hall, R. M. (2019). Mobilisation of a small *Acinetobacter* plasmid carrying an oriT transfer origin by conjugative RepAci6 plasmids. *Plasmid* 103, 36–44. doi: 10.1016/j.plasmid.2019.04.002
- Brandt, C., Viehweger, A., Singh, A., Pletz, M. W., Wibberg, D., Kalinowski, J., et al. (2019). Assessing genetic diversity and similarity of 435 KPC-carrying plasmids. *Sci. Rep.* 9:11223. doi: 10.1038/s41598-019-47758-5
- Cabezón, E., Ripoll-Rozada, J., Peña, A., de la Cruz, F., and Arechaga, I. (2015). Towards an integrated model of bacterial conjugation. *FEMS Microbiol. Rev.* 39, 81–95. doi: 10.1111/1574-6976.12085
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., et al. (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 10:421. doi: 10.1186/1471-2105-10-421
- Cameranesi, M. M., Limansky, A. S., Morán-Barrio, J., Repizo, G. D., and Viale, A. M. (2017). Three novel *Acinetobacter baumannii* plasmid replicase-homology groups inferred from the analysis of a multidrug-resistant clinical strain isolated in Argentina. *J. Infect. Dis. Epidemiol.* 3:46. doi: 10.23937/2474-3658/1510046
- Cameranesi, M. M., Morán-Barrio, J., Limansky, A. S., Repizo, G. D., and Viale, A. M. (2018). Site-specific recombination at XerC/D sites mediates the formation and resolution of plasmid co-integrates carrying a blaOXA-58- and TnaphA6-Resistance module in *Acinetobacter baumannii*. *Front. Microbiol.* 9:66. doi: 10.3389/fmicb.2018.00066
- Carattoli, A. (2013). Plasmids and the spread of resistance. *Int. J. Med. Microbiol.* 303, 298–304. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.02.001
- Castro-Jaimes, S., Salgado-Camargo, A. D. A. D., Graña-Miraglia, L., Lozano, L., Bocanegra-Ibarias, P., Volkow-Fernández, P., et al. (2016). Complete genome sequence of a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolate obtained from a Mexican hospital (Sequence Type 422). *Genome Announc.* 4:e00583-16. doi: 10.1128/genomeA.00583-16
- Chatterjee, S., Mondal, A., Mitra, S., and Basu, S. (2017). *Acinetobacter baumannii* transfers the blaNDM-1 gene via outer membrane vesicles. *J. Antimicrob. Chemother.* 72, 2201–2207. doi: 10.1093/jac/dkx131
- Chattoraj, D. K. (2000). Control of plasmid DNA replication by iterons: no longer paradoxical. *Mol. Microbiol.* 37, 467–476. doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.01986.x
- Cock, P. J. A., Antao, T., Chang, J. T., Chapman, B. A., Cox, C. J., Dalke, A., et al. (2009). Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. *Bioinformatics* 25, 1422–1423. doi: 10.1093/bioinformatics/btp163
- Da Silva, G. J., and Domingues, S. (2016). Insights on the horizontal gene transfer of carbapenemase determinants in the opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Microorganisms* 4:29. doi: 10.3390/microorganisms4030029
- D'Andrea, M. M., Giani, T., D'Arezzo, S., Capone, A., Petrosillo, N., Visca, P., et al. (2009). Characterization of pABVA01, a plasmid encoding the OXA-24 carbapenemase from Italian isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 3528–3533. doi: 10.1128/AAC.00178-09

- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., and Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods* 9, 772–772. doi: 10.1038/nmeth.2109
- del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarría, M. J., Espinosa, M., and Díaz-Orejas, R. (1998). Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 434–464. doi: 10.1128/mmbr.62.2.434-464.1998
- Di Venanzio, G., Moon, K. H., Weber, B. S., Lopez, J., Ly, P. M., Potter, R. F., et al. (2019). Multidrug-resistant plasmids repress chromosomally encoded T6SS to enable their dissemination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 116, 1378–1383. doi: 10.1073/pnas.1812557116
- Diancourt, L., Passet, V., Nemec, A., Dijkshoorn, L., and Brisse, S. (2010). The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PLoS One* 5:e10034. doi: 10.1371/journal.pone.0010034
- Eddy, S. R. (2011). Accelerated profile HMM searches. *PLoS Comput. Biol.* 7:e1002195. doi: 10.1371/journal.pcbi.1002195
- El-Gebali, S., Mistry, J., Bateman, A., Eddy, S. R., Luciani, A., Potter, S. C., et al. (2019). The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acids Res.* 47, D427–D432. doi: 10.1093/nar/gky995
- Fondi, M., Bacci, G., Brilli, M., Papaleo, M. C., Mengoni, A., Vanechoutte, M., et al. (2010). Exploring the evolutionary dynamics of plasmids: the *Acinetobacter* pan-plasmidome. *BMC Evol. Biol.* 10:59. doi: 10.1186/1471-2148-10-59
- Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O., and Toussaint, A. (2005). Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 722–732. doi: 10.1038/nrmicro1235
- Grosso, F., Quinteira, S., Poirel, L., Novais, A., and Peixe, L. (2012). Role of common blaOXA-24/OXA-40-carrying plasmids and plasmids in the spread of OXA-24/OXA-40 among *Acinetobacter* species clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 3969–3972. doi: 10.1128/AAC.06255-11
- Guindon, S., and Gascuel, O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52, 696–704. doi: 10.1080/10635150390235520
- Hagberg, A. A., Schult, D. A., and Swart, P. J. (2008). “Exploring network structure, dynamics, and function using NetworkX,” in *Proceedings of the 7th Python in Science Conference (SciPy2008)*, eds G. Varoquaux, T. Vaught, and J. Millman (Pasadena, CA), 11–15.
- Hamidian, M., and Hall, R. M. (2018a). Genetic structure of four plasmids found in *Acinetobacter baumannii* isolate D36 belonging to lineage 2 of global clone 1. *PLoS One* 13:e0204357. doi: 10.1371/journal.pone.0204357
- Hamidian, M., and Hall, R. M. (2018b). The AbaR antibiotic resistance islands found in *Acinetobacter baumannii* global clone 1 - Structure, origin and evolution. *Drug Resist. Updat.* 41, 26–39. doi: 10.1016/j.drug.2018.10.003
- Hamidian, M., Kenyon, J. J., Holt, K. E., Pickard, D., and Hall, R. M. (2014). A conjugative plasmid carrying the carbapenem resistance gene blaOXA-23 in AbaR4 in an extensively resistant GC1 *Acinetobacter baumannii* isolate. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 2625–2628. doi: 10.1093/jac/dku188
- Hayes, F., and Van Melder, L. (2011). Toxins-antitoxins: diversity, evolution and function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 46, 386–408. doi: 10.3109/10409238.2011.600437
- Higgins, P. G., Dammhayn, C., Hackel, M., and Seifert, H. (2010). Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 233–238. doi: 10.1093/jac/dkp428
- Huang, H., Dong, Y., Yang, Z.-L., Luo, H., Zhang, X., and Gao, F. (2014). Complete sequence of pABTJ2, a plasmid from *Acinetobacter baumannii* MDR-TJ, carrying many phage-like elements. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 12, 172–177. doi: 10.1016/j.gpb.2014.05.001
- Hujer, A. M., Higgins, P. G., Rudin, S. D., Buser, G. L., Marshall, S. H., Xanthopoulos, K., et al. (2017). Nosocomial outbreak of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates containing blaOXA-237 carried on a plasmid. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61:e00797-17. doi: 10.1128/AAC.00797-17
- Hülter, N., Ilhan, J., Wein, T., Kadibalban, A. S., Hammerschmidt, K., and Dagan, T. (2017). An evolutionary perspective on plasmid lifestyle modes. *Curr. Opin. Microbiol.* 38, 74–80. doi: 10.1016/j.mib.2017.05.001
- Jain, A., and Srivastava, P. (2013). Broad host range plasmids. *FEMS Microbiol. Lett.* 348, 87–96. doi: 10.1111/1574-6968.12241
- Jurenaite, M., Markuckas, A., and Suziedeliene, E. (2013). Identification and characterization of type II toxin-antitoxin systems in the opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii*. *J. Bacteriol.* 195, 3165–3172. doi: 10.1128/JB.00237-13
- Kück, P., and Longo, G. C. (2014). FASconCAT-G: extensive functions for multiple sequence alignment preparations concerning phylogenetic studies. *Front. Zool.* 11:81. doi: 10.1186/s12983-014-0081-x
- Kulakauskas, S., Lubys, A., and Ehrlich, S. D. (1995). DNA restriction-modification systems mediate plasmid maintenance. *J. Bacteriol.* 177, 3451–3454. doi: 10.1128/jb.177.12.3451-3454.1995
- Lean, S. S., and Yeo, C. C. (2017). Small, enigmatic plasmids of the nosocomial pathogen, *Acinetobacter baumannii*: good, bad, who knows? *Front. Microbiol.* 8:1547. doi: 10.3389/fmicb.2017.01547
- Lobato-Márquez, D., Díaz-Orejas, R., and García-Del Portillo, F. (2016). Toxin-antitoxins and bacterial virulence. *FEMS Microbiol. Rev.* 40, 592–609. doi: 10.1093/femsre/fuw022
- Martin, D. P., Murrell, B., Golden, M., Khoosal, A., and Muhire, B. (2015). RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evol.* 1:vev003. doi: 10.1093/ve/vev003
- Merino, M., Acosta, J., Poza, M., Sanz, F., Beceiro, A., Chaves, F., et al. (2010). OXA-24 carbapenemase gene flanked by XerC/XerD-like recombination sites in different plasmids from different *Acinetobacter* species isolated during a nosocomial outbreak. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 2724–2727. doi: 10.1128/AAC.01674-09
- Mosqueda, N., Gato, E., Roca, I., López, M., de Alegría, C. R., Fernández Cuenca, F., et al. (2014). Characterization of plasmids carrying the blaOXA-24/40 carbapenemase gene and the genes encoding the AbkA/AbkB proteins of a toxin/antitoxin system. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 2629–2633. doi: 10.1093/jac/dku179
- Novick, R. P. (1987). Plasmid incompatibility. *Microbiol. Rev.* 51, 381–395.
- O'Brien, F. G., Ramsay, J. P., Monecke, S., Coombs, G. W., Robinson, O. J., Htet, Z., et al. (2015a). Staphylococcus aureus plasmids without mobilization genes are mobilized by a novel conjugative plasmid from community isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 70, 649–652. doi: 10.1093/jac/dku454
- O'Brien, F. G., Yui Eto, K., Murphy, R. J. T., Fairhurst, H. M., Coombs, G. W., Grubb, W. B., et al. (2015b). Origin-of-transfer sequences facilitate mobilisation of non-conjugative antimicrobial-resistance plasmids in *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res.* 43, 7971–7983. doi: 10.1093/nar/gkv755
- Page, A. J., Cummins, C. A., Hunt, M., Wong, V. K., Reuter, S., Holden, M. T. G., et al. (2015). Roary: Rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics* 31, 3691–3693. doi: 10.1093/bioinformatics/btv421
- Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N., and Jensen, S. O. (2018). Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 31:e00088-17. doi: 10.1128/CMR.00088-17
- Pérez-Oseguera, A., Castro-Jaimes, S., Salgado-Camargo, A. D., Silva-Sanchez, J., Garza-González, E., Castillo-Ramírez, S., et al. (2017). Complete genome sequence of a blaOXA-58-producing *Acinetobacter baumannii* strain isolated from a Mexican hospital. *Genome Announc.* 5:e00949-17. doi: 10.1128/genomeA.00949-17
- Pesky, M. W., Tilley, R., and Beck, D. A. C. (2019). Mosaic plasmids are abundant and unevenly distributed across prokaryotic taxa. *Plasmid* 102, 10–18. doi: 10.1016/j.plasmid.2019.02.003
- Poirel, L., and Nordmann, P. (2006). Genetic structures at the origin of acquisition and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene blaOXA-58 in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 1442–1448. doi: 10.1128/AAC.50.4.1442-1448.2006
- Roca, I., Espinal, P., Vila-Farrés, X., and Vila, J. (2012). The *Acinetobacter baumannii* oxymoron: commensal hospital dweller turned pan-drug-resistant menace. *Front. Microbiol.* 3:148. doi: 10.3389/fmicb.2012.00148
- Rumbo, C., Fernández-Moreira, E., Merino, M., Poza, M., Mendez, J. A., Soares, N. C., et al. (2011). Horizontal transfer of the OXA-24 carbapenemase gene via outer membrane vesicles: a new mechanism of dissemination of carbapenem resistance genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 3084–3090. doi: 10.1128/AAC.00929-10
- Salto, I. P., Torres Tejerizo, G., Wibberg, D., Pühler, A., Schlüter, A., and Pistorio, M. (2018). Comparative genomic analysis of *Acinetobacter* spp. plasmids originating from clinical settings and environmental habitats. *Sci. Rep.* 8:7783. doi: 10.1038/s41598-018-26180-3
- San Millán, A. (2018). Evolution of plasmid-mediated antibiotic resistance in the clinical context. *Trends Microbiol.* 26, 978–985. doi: 10.1016/j.tim.2018.06.007

- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., et al. (2014). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 7, 539–539. doi: 10.1038/msb.2011.75
- Siguier, P., Gourbeyre, E., and Chandler, M. (2014). Bacterial insertion sequences: their genomic impact and diversity. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 865–891. doi: 10.1111/1574-6976.12067
- Siguier, P., Perochon, J., Lestrade, L., Mahillon, J., and Chandler, M. (2006). ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Res.* 34, D32–D36. doi: 10.1093/nar/gkj014
- Smillie, C., Garcillán-Barcia, M. P., Francia, M. V., Rocha, E. P. C., and de la Cruz, F. (2010). Mobility of plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 434–452. doi: 10.1128/MMBR.00020-10
- Summers, D. K., Beton, C. W., and Withers, H. L. (1993). Multicopy plasmid instability: the dimer catastrophe hypothesis. *Mol. Microbiol.* 8, 1031–1038. doi: 10.1111/j.1365-2958.1993.tb01648.x
- Summers, D. K., and Sherratt, D. J. (1988). Resolution of ColE1 dimers requires a DNA sequence implicated in the three-dimensional organization of the *cer* site. *EMBO J.* 7, 851–858. doi: 10.1002/j.1460-2075.1988.tb02884.x
- Sužiedėlienė, E., Jurėnaitė, M., and Armalytė, J. (2016). "Identification and characterization of type II toxin-antitoxin systems in the opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii*," in *Stress and Environmental Regulation of Gene Expression and Adaptation in Bacteria*, ed. F. J. de Bruijn (Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc), 454–462. doi: 10.1002/9781119004813.ch41
- Taboada, B., Verde, C., and Merino, E. (2010). High accuracy operon prediction method based on STRING database scores. *Nucleic Acids Res.* 38:e130. doi: 10.1093/nar/gkq254
- Tatusov, R. L., Fedorova, N. D., Jackson, J. D., Jacobs, A. R., Kiryutin, B., Koonin, E. V., et al. (2003). The COG database: an updated version includes eukaryotes. *BMC Bioinformatics* 4:41. doi: 10.1186/1471-2105-4-41
- Thomas, C. M., Thomson, N. R., Cerdeño-Tárraga, A. M., Brown, C. J., Top, E. M., and Frost, L. S. (2017). Annotation of plasmid genes. *Plasmid* 91, 61–67. doi: 10.1016/j.plasmid.2017.03.006
- Tschäpe, H. (1994). The spread of plasmids as a function of bacterial adaptability. *FEMS Microbiol. Ecol.* 15, 23–31. doi: 10.1016/0168-6496(94)90022-1
- Unterholzner, S. J., Poppenberger, B., and Rozhon, W. (2013). Toxin-antitoxin systems: Biology, identification, and application. *Mob. Genet. Elements* 3:e26219. doi: 10.4161/mge.26219
- Val, M.-E., Bouvier, M., Campos, J., Sherratt, D., Cornet, F., Mazel, D., et al. (2005). The single-stranded genome of phage CTX is the form used for integration into the genome of *Vibrio cholerae*. *Mol. Cell* 19, 559–566. doi: 10.1016/j.molcel.2005.07.002
- Weber, B. S., Ly, P. M., Irwin, J. N., Pukatzki, S., and Feldman, M. F. (2015). A multidrug resistance plasmid contains the molecular switch for type VI secretion in *Acinetobacter baumannii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 9442–9447. doi: 10.1073/pnas.1502966112
- Weber, B. S., Miyata, S. T., Iwashiki, J. A., Mortensen, B. L., Skaar, E. P., Pukatzki, S., et al. (2013). Genomic and functional analysis of the type VI secretion system in *Acinetobacter*. *PLoS One* 8:e55142. doi: 10.1371/journal.pone.0055142
- Wegrzyn, K. E., Gross, M., Uciechowska, U., and Konieczny, I. (2016). Replisome assembly at bacterial chromosomes and iteron plasmids. *Front. Mol. Biosci.* 3:39. doi: 10.3389/fmolb.2016.00039
- Wernersson, R., and Pedersen, A. G. (2003). RevTrans: Multiple alignment of coding DNA from aligned amino acid sequences. *Nucleic Acids Res.* 31, 3537–3539. doi: 10.1093/nar/gkg609
- Wibberg, D., Salto, I. P., Eikmeyer, F. G., Maus, I., Winkler, A., Nordmann, P., et al. (2018). Complete genome sequencing of *Acinetobacter baumannii* strain K50 discloses the large conjugative plasmid pK50a encoding carbapenemase OXA-23 and extended-spectrum β -Lactamase GES-11. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62:e00212-18. doi: 10.1128/AAC.00212-18
- Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L., and Holt, K. E. (2017). Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput. Biol.* 13:e1005595. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005595
- Wickham, H. (2009). *ggplot2*. New York, NY: Springer.
- Wyres, K. L., and Holt, K. E. (2018). *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 45, 131–139. doi: 10.1016/j.mib.2018.04.004
- Yau, S., Liu, X., Djordjevic, S. P., and Hall, R. M. (2010). RSF1010-like plasmids in Australian *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and origin of their sul2-strA-strB antibiotic resistance gene cluster. *Microb. Drug Resist.* 16, 249–252. doi: 10.1089/mdr.2010.0033
- Zankari, E. E., Hasman, H., Cosentino, S., Vestergaard, M., Rasmussen, S., Lund, O., et al. (2012). Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 2640–2644. doi: 10.1093/jac/dk261
- Zarrilli, R., Pournaras, S., Giannouli, M., and Tsakris, A. (2013). Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. *Int. J. Antimicrob. Agents* 41, 11–19. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2012.09.008

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Salgado-Camargo, Castro-Jaimes, Gutierrez-Rios, Lozano, Altamirano-Pacheco, Silva-Sanchez, Pérez-Oseguera, Volkow, Castillo-Ramírez and Cevallos. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Conclusiones.

Los análisis bioinformáticos de este estudio nos permitieron organizar a los plásmidos de nuestra colección en tan solo 23 linajes clonales, estos linajes son grupos de replicones que se encuentran estrechamente relacionados debido a su carga genética. 128 plásmidos se encuentran distribuidos entre los linajes y 47 permanecieron sin asociarse con alguno.

En cada linaje identificamos un genoma core el cual posee una amplia variedad de genes conservados con diversas funciones, algunos involucrados con su biología básica y movilización, sin embargo, la mayoría de estos genes codifican para proteínas con funciones desconocidas y posiblemente estén reduciendo el costo del fitness en la replicación. Los plásmidos de cada linaje tienen una estructura y contenido genético muy similar.

Logramos detectar a través de nuestros análisis que, en los 175 plásmidos de la colección, sólo 138 presentaron un gen *rep* intacto, 11 tuvieron pseudogenes *rep* y 27 exhibieron una replicasa irreconocible hasta el momento. Siguiendo la nomenclatura propuesta por Bertini y colaboradores logramos extender el esquema de clasificación al definir 11 grupos de homología adicionales (GR24 - GR34). Los plásmidos del mismo linaje presentan las mismas proteínas de replicación y, por lo tanto, se clasifican dentro del mismo grupo de homología (GR), de esta manera cada linaje se caracteriza por representar a un grupo de incompatibilidad plasmídico.

En los linajes LN_7 y LN_8 nos fue posible identificar al operón clásico (*parA/parB*) del sistema de partición, en otros (LN_3, LN_11, LN_14 y LN_19) se presentó el sistema incompleto, es decir, solo identificamos a uno de los dos componentes de operón. El LN_8 exhibió un sistema de partición secundario debido a la presencia de la proteína ParM-like. En el resto de los linajes en donde no detectamos dichos genes de este módulo, es posible que utilicen un sistema de segregación que aún no ha sido descrito.

Revelamos que 108 plásmidos presentaron nueve diferentes módulos Toxina-Antitoxina, distribuidos en siete linajes (LN_1, LN_2, LN_13, LN_15, LN_17 y LN_22). El sistema tipo II ZetaTA fue el más frecuente (43.5%) y el menos común fue el módulo AbiEii/AbiGii (1%).

El set completo de genes responsables de la automovilización plasmídica solo lo identificamos en los linajes LN_1, LN_5 y en dos plásmidos huérfanos. Algunos linajes son potencialmente movilizables solo por la presencia de la relaxasa, mientras que los linajes sin evidencia de estos genes podrían utilizar un mecanismo alternativo de propagación.

Los plásmidos analizados en este estudio tienen la capacidad de replicar en una extensa gama de especies bacterianas patógenas como *K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. entérica* y *E. aerogenes*, mientras que otros se encuentran restringidos a replicar solo en especies del género *Acinetobacter*.

En el 51.7% de los plásmidos de nuestra colección logramos identificar 41 tipos diferentes de secuencias de inserción (IS). La diversidad y cantidad de estos elementos fue muy variada entre los linajes, en algunos todos los plásmidos exhibieron mínimo una IS, ciertos linajes abarcaron numerosos tipos de IS, en otros solo algunos miembros presentaron y los demás no, y finalmente, el resto de los linajes no presentó ninguna IS; revelando que pertenecen a estructuras de adquisición secundaria.

Trece linajes que corresponden con el 34.6% de los plásmidos albergaron determinantes de resistencia contra diversos tipos de familias de antibióticos. Los genes más frecuentes fueron los que codifican para la resistencia contra aminoglucósidos (presentes en el 60.6% de los plásmidos con resistencia) mientras que los genes que encontramos en menor cantidad (solo en el 14.7% de los plásmidos resistentes) fueron contra macrólidos. Algunos de estos

determinantes los localizamos asociados a otros elementos genéticos móviles como IS principalmente, integrones de clase 1 e islas de resistencia tipo AbaR.

Determinamos que el flujo genético entre los linajes se encuentra limitado al intercambio de IS, a determinantes asociados a estos elementos y a proteínas con funciones desconocidas.

Perspectivas.

Dilucidar con la ayuda de herramientas experimentales el tipo de replicasa que presentan aquellos plásmidos en los cuales no nos fue posible detectar el gen que codifica para dicha proteína.

Comprobar si los plásmidos de *A. baumannii* que carecen de los genes necesarios para la movilización utilizan otros mecanismos de transmisión como transformación, transporte a través de vesículas o transducción.

Identificar el sistema de segregación de los plásmidos en los que no hallamos a los genes clásicos del módulo y que posiblemente usen un sistema alternativo que no se ha reportado en *A. baumannii*, pero que si se ha descrito en otras bacterias.

Generar una plataforma tipo MLST en la cual podamos agregar exclusivamente secuencias de plásmidos para actualizar a los linajes existentes o bien, para la adición de nuevos.

Referencias.

- Nemeč A. 2022. *Acinetobacter*. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. New York: Wiley, 1-78. DOI: 10.1002/9781118960608.
- Dijkshoorn, L., 2008. The diversity of the genus *Acinetobacter*. In: Gerischer, U. (Ed.), *Acinetobacter Molecular Biology*. Caister Academic Press, ISBN.
- Doughari, H.J., Ndakidemi, P.A., Human, I.S., Benade, S., 2011. The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: an overview. *Microbes Environ.* 26, 101–112.
- Munoz-Price, L.S., Weinstein, R.A., 2008. *Acinetobacter* infection. *N. Engl. J. Med.* 358, 1271–1281.
- Jung, J., Park, W., 2015. *Acinetobacter* species as model microorganisms in environmental microbiology: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 2533–2548
- Brisou, J., Prevot, A., 1954. Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under *Acromobacter* group. *Ann. Inst. Pasteur.* 86, 722–728.
- Baumann, P., Doudoroff, M., and Stanier, R.Y. (1968). A study of the *Moraxella* group. II. Oxidativenegative species (genus *Acinetobacter*). *J. Bacteriol.* 95, 1520–1541.
- Lessel EF. 1971. Minutes of the subcommittee of the taxonomy of moraxella and allied bacteria. *Int J Syst Bacteriol*; 21:213-4.
- Bouvet, P.J., and Grimont, P.A. 1986. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov., and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36, 228–240.
- Bouvet, P.J., and Jeanjean, S. 1989. Delineation of new proteolytic genomic species in the genus *Acinetobacter*. *Res. Microbiol.* 140, 291–299.
- Allen DM, Hartman BJ. Género *Acinetobacter*. En Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. 2009. Principios y práctica de enfermedades infecciosas. 7ma. Ed. Barcelona: Editorial, DRK edición;vol 2: 2885-9.
- Muñoz Price LS, Weinstein RA. 2008. *Acinetobacter* infection. *N Engl J Med*;358:1271-8.
- Peleg A, Seifert H, Paterson DL. 2008. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev*; 21:538-82; PMID:18625687.
- Doughari H.J., Ndakidemi P.A., Human I.S., Benade S., 2011. The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: an overview. *Microbes Environ.* 26, 101–112.
- Beggs, C., Kerr, K., Snelling, A., Sleight, P., 2006. *Acinetobacter* spp. and the clinical environment. *Indoor Built Environ.* 15, 19–24.
- Gerner-Smidt P, Tjernberg I, Ursing J. 1991. Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. *J Clin Microbiol*; 29:277-82; PMID: 2007635.
- Gerner-Smidt, P. 1992. Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *J. Clin. Microbiol.* 30:2680–2685

- Hernández T, García V, Yagüe G, Gómez G. 2010. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*: clinical update and new highlights. *Rev Esp Quimioter* 2010;23(1):12-19.
- Kanafani, A.Z., Kanj, S.S., 2014. Ministry of Health, Kingdom of Saudi Arabia. [Http/update.com/contents/acinetobacter-infection-treatment-and-prevention](http://update.com/contents/acinetobacter-infection-treatment-and-prevention).
- Lin, M. F., Lin, Y. Y., Yeh, H. W., and Lan, C. Y. 2014. Role of the BaeSR two-component system in the regulation of *Acinetobacter baumannii* adeAB genes and its correlation with tigecycline susceptibility. *BMC Microbiol.* 14:119. doi: 10.1186/1471-2180-14-119.
- Vincent, J. L., Rello, J., Marshall, J., Silva, E., Anzueto, A., Martin, C. D., et al. 2009. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA* 302, 2323–2329. doi: 10.1001/jama.2009.1754.
- Lee, K., Yong, D., Jeong, S.H., Chong, Y., 2011. Multidrug-resistant *Acinetobacter* spp.: increasingly problematic nosocomial pathogens. *Yonsei Med. J.* 52, 879–891.
- Jung, J., Park, W., 2015. *Acinetobacter* species as model microorganisms in environmental microbiology: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 2533–2548.
- Magill SS, et al. 2014. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. *N Engl J Med* 370, 1198–1208, doi:10.1056/NEJMoa1306801. [PubMed: 24670166].
- Lob SH, Hoban DJ, Sahm DF & Badal RE. 2016. Regional differences and trends in antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents* 47, 317–323, doi:10.1016/j.ijantimicag.2016.01.015. [PubMed: 27020541].
- Giammanco A, Cala C, Fasciana T & Dowzicky MJ. 2017. Global Assessment of the Activity of Tigecycline against Multidrug-Resistant Gram-Negative Pathogens between 2004 and 2014 as Part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial. *mSphere* 2, doi:10.1128/mSphere.00310-16.
- Luna, C.M., Aruj, P.K., 2007. Nosocomial *acinetobacter* pneumonia. *Respirology* 12, 787–791.
- Doughari, H.J., Ndakidemi, P.A., Human, I.S., Benade, S., 2011. The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: an overview. *Microbes Environ.* 26, 101–112.
- Cisneros, J., Rodriguez-Bano, J., 2002. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment. *Clin. Microbiol. Infect.* 8, 687–693.
- Garnacho-Montero, J., Amaya-Villar, R., Ferrández-Millo'n, C., DíazMartín, A., López-Sánchez, J.M., Gutiérrez-Pizarraya, A., 2015. Optimum treatment strategies for carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.*, 1–9.
- Falagas, M.E., Vardakas, K.Z., Kapaskelis, A., Triarides, N.A., Roussos, N.S., 2015. Tetracyclines for multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Int. J. Antimicrob. Agents*.
- Basri, R., Zueter, A.R., Mohamed, Z., Alam, M.K., Norsa'adah, B., Hasan, S.A., Hasan, H., Ahmad, F., 2015. Burden of bacterial meningitis: a retrospective review on laboratory

parameters and factors associated with death in meningitis, Kelantan Malaysia. *Nagoya J. Med. Sci.* 77, 59.

- Kamolvit, W., Sidjabat, H.E., Paterson, D.L., 2015. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance of *Acinetobacter* spp. in Asia and Oceania. *Microb. Drug Resist.* 21, 424–434.
- Jeon, J. H., Lee, J. H., Lee, J. J., Park, K. S., Karim, A. M., Lee, C. R., et al. 2015. Structural basis for carbapenem-hydrolyzing mechanisms of carbapenemases conferring antibiotic resistance. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 9654–9692. doi: 10.3390/ijms16059654.
- Manchanda, V., Sanchaita, S., Singh, N., 2010. Multidrug resistant acinetobacter. *J. Global Infect. Dis.* 2, 291.
- Nowak, J., Seifert, H., Higgins, P.G., 2015. Prevalence of eight RNDefflux pump genes in epidemiologically characterised *Acinetobacter baumannii* of worldwide origin. *J. Med. Microbiol.*, 000069.
- Gehrlein, M., Leying, H., Cullmann, W., Wendt, S., and Opferkuch, W. (1991). Imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* is due to altered penicillin-binding proteins. *Chemotherapy* 37, 405–412.
- Fernández-Cuenca F, Martínez-Martínez L, Conejo MC, Ayala JA, Perea EJ, Pascual A. 2003. Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*;51:565-74.
- Bou G, Martínez-Beltrán J. 2000. Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*;44:428-32.
- Héritier C, Poirel L, Nordmann P. 2006. Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of ISAb₁ in *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* ;12:123-30.
- Rice LB. 2006. Challenges in identifying new antimicrobial agents effective for treating infections with *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis* ;43:100-5.
- Jain, R., Danziger, L.H., 2004. Multidrug-resistant *Acinetobacter* infections: an emerging challenge to clinicians. *Ann. Pharmacother.* 38, 1449–1459.
- Ghafourian, S.; Sadeghifard, N.; Soheili, S.; Sekawi, Z. 2015. Extended spectrum beta-lactamases: Definition, classification and epidemiology. *Curr. Issues Mol. Biol.* 17, 11–22.
- Tooke, C.L, Hinchliffe, P. Bragginton, E.C. Colenso, C.K. Hirvonen, V.H.A. Takebayashi, Y. Spencer, J. 2019. β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *J. Mol. Biol.* 431, 3472–3500.
- Cornaglia, G. Giamarellou, H. Rossolini, G.M. 2011. Metallo- β -lactamases: A last frontier for β -lactams? *Lancet Infect. Dis.* 11, 381–393.
- Wong, M.H.-Y.; Chan, B.K.-W.; Chan, E.W.-C.; Chen, S. 2019. Over-Expression of ISAb₁-Linked Intrinsic and Exogenously Acquired OXA Type Carbapenem-Hydrolyzing-

- Class D- β -Lactamase-Encoding Genes Is Key Mechanism Underlying Carbapenem Resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Front. Microbiol.* 10, 2809.
- Evans B, Hamouda A, Towner KJ, Amyes SGB. 2008. OXA-51-like beta-lactamases and their association with particular epidemic lineages of *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect*; 14: 268-75.
 - Poirel, L.; Naas, T.; Nordmann, P. 2010 Diversity, epidemiology, and genetics of class D β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 24–38. 2010.
 - Bou G, Oliver A, Martinez-Beltran J. 2000. OXA-24, a novel class D β -lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:1556 –1561.
 - Acosta J, Merino M, Viedma E, Poza M, Sanz F, Otero JR, Chaves F, Bou G. 2011. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* harboring OXA-24 carbapenemase, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 17:1064 –1067.
 - Evans B & Sebastian G. 2014. OXA- β -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*: 27: 241–263.
 - Poirel L, Figueiredo S, Cattoir V, Carattoli A, Nordmann P. 2008a. *Acinetobacter radioresistens* as a silent source of carbapenem resistance for *Acinetobacter* spp. *Antimicrob Agents Chemother*; 52: 1252-6
 - Bonnet R, Marchandin H, Chanal C, Sirot D, Labia R, De Champs C et al. 2002. Chromosome-encoded class D β -lactamase OXA-23 in *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother*; 46: 2004-6.
 - Evans B & Sebastian G. 2014. OXA- β -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*: 27: 241–263.
 - Poirel L, Mansour W, Bouallegue O, et al. 2008. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Tunisia producing the OXA-58-like carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-97. *Antimicrob Agents Chemother.* ;52(5):1613–1617. doi:10.1128/AAC.00978-07.
 - Perez, F., Hujer, A.M., Hujer, K.M., Decker, B.K., Rather, P.N., Bonomo, R.A., 2007. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 3471–3484.
 - Catel-Ferreira, M., Coadou, G., Molle, V., Mugnier, P., Nordmann, P., Siroy, A., et al. 2011. Structure-function relationships of CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 2053–2056. doi: 10.1093/jac/dkr267.
 - Smani, Y., Fabrega, A., Roca, I., Sanchez-Encinales, V., Vila, J., and Pachon, J. 2014. Role of OmpA in the multidrug resistance phenotype of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 1806–1808. doi: 10.1128/AAC.02101-13.
 - Wu, X., Chavez, J. D., Schweppe, D. K., Zheng, C., Weisbrod, C. R., Eng, J. K., et al. 2016. In vivo protein interaction network analysis reveals porin-localized antibiotic inactivation in *Acinetobacter baumannii* strain AB5075. *Nat. Commun.* 7:13414. doi: 10.1038/ncomms 13414.

- Fernandez-Cuenca, F., L. Martinez-Martinez, M. C. Conejo, J. A. Ayala, E. J. Perea, A. Pascual. 2003. Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 51:565–574.
- Garneau-Tsodikova, S.; Labby, K.J. 2016. Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics: Overview and perspectives. *MedChemComm.*
- Xu, C.; Bilya, S.R.; Xu, W. 2019. *adeABC* efflux gene in *Acinetobacter baumannii*. *New Microbes New Infect.* 30, 100549.
- Potron, A., Poirel, L., Nordmann, P., 2015. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Int. J. Antimicrob. Agents* 45, 568– 585.
- Reis, A. O., D. A. Luz, M. C. Tognim, H. S. Sader, and A. C. Gales. 2003. Polymyxin-resistant *Acinetobacter* spp. isolates: what is next? *Emerg. Infect. Dis.* 9:1025–1027.
- Cai, Y., Chai, D., Wang, R., Liang, B., and Bai, N. 2012 . Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 1607–1615. doi: 10.1093/jac/dks084.
- Moffatt, J.H.; Harper, M.; Boyce, J.D. 2019. Mechanisms of Polymyxin Resistance. *Adv. Exp. Med. Biol.* , 1145, 55–71.
- Corbella X, Pujol M, Ayats J et al. 1996. Relevance of digestive tract colonization in the epidemiology of nosocomial infections due to multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Infect Dis* ; 23: 329–34.
- D’Agata EMC, Thayer V, Schaffner W. 2000. An outbreak of *Acinetobacter baumannii*: the importance of cross-transmission. *Infect Control Hosp Epidemiol*; 21: 588–91.
- Tacconelli E, Cataldo MA, De Pascale G, Manno D, Spanu T, Cambieri A, et al. 2008. Prediction models to identify hospitalized patients at risk of being colonized or infected with multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* calcoaceticus complex. *J Antimicrob Chemother*;62:1130e7.
- Fournier, P.E., Richet, H., Weinstein, R.A., 2006. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clin. Infect. Dis.* 42, 692–699.
- Zowawi, H.M., Sartor, A.L., Sidjabat, H.E., Balkhy, H.H., Walsh, T. R., Al Johani, S.M., Aljindan, R.Y., Alfaresi, M., Ibrahim, E., AlJardani, A., 2015. Molecular epidemiology of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* in the Gulf Cooperation Council States. Dominance of OXA-23-type producers. *J. Clin. Microbiol.*, 02784– 02714 596.
- Diancourt L, Passet V, Nemeč A, Dijkshoorn L, Brisse S .2010. The Population Structure of *Acinetobacter baumannii*: Expanding Multiresistant Clones from an Ancestral Susceptible Genetic Pool. *PLoS ONE* 5(4): e10034. doi:10.1371/journal.pone.0010034.
- Bartual, S. G., H. Seifert, C. Hippler, M. A. Luzon, H. Wisplinghoff, and F. Rodriguez-Valera. 2005. Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* 43:4382–4390.

- 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 Microbiol*; 9:1179–94.
- Seifert H, Dolzani L, Bressan R, Reijden T, Strijen B, Stefanik D et al. 2005. Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of Pulsed-Field Gel Electrophoresis-Generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol*; 43: 4328-35.
- Stietz M, Ramírez M, Vilacoba E, Merkier A, Limansky A, Centrón D, Catalano M. 2013. *Acinetobacter baumannii* extensively drug resistant lineages in Buenos Aires hospitals differ from the international clones I–III, *Infection, Genetics and Evolution*. Volume 14, 294-301.
- Grosso F, Quinteira S, Peixe L. 2011. Understanding the dynamics of imipenem resistant *Acinetobacter baumannii* lineages within Portugal. *Clin Microbiol Infect*;17:1275–9.
- Higgins P, Dammhayn C, Hackel M, Seifert H. 2010. Global spread of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*;65:233–8.
- Adams M, Goglin K, Molyneaux N, Hujer K, Lavender H, Jamison J, et al. 2008. Comparative genome sequence analysis of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol*;190:8053–64.
- Di Nocera P, Rocco F, Giannouli M, Triassi M, Zarrilli R. 2011. Genome organization of epidemic *Acinetobacter baumannii* strains. *BMC Microbiol*;11: 224.
- Vallenet D, Nordmann P, Barbe V, Poirel L, Mangenot S., et al. 2008. Comparative analysis of *Acinetobacter* genomes: three genomes for three lifestyles. *PLoS One* 3, e1805.
- Iacono M, Villa L, Fortini D, Bordoni R, Imperi F, et al. 2008. Whole-genome pyrosequencing of an epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain belonging to the European clone II group. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 2616–2625.
- Hornsey M, Loman N, Warheam D, Ellington M, Pallen M, Turton J, et al. 2011. Whole-genome comparison of two *Acinetobacter baumannii* isolates from a single patient, where resistance developed during tigecycline therapy. *J Antimicrob Chemother*;66:1499–503.
- Medini D, Donati C, Tettelin H, Massignani V, Rappuoli R. 2005. The microbial pan-genome. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 15, 589–594.
- Schmidt H, Hensel M. 2004. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin Microbiol Rev.*;17:14–56.
- Fournier P, Vallenet D, Barbe V, Audic S, Ogata H., et al. 2006. Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Genet.* 2,e7.
- Post V, White P, Hall R. 2010. Evolution of AbaR-type genomic resistance islands in multiply antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 1162–1170.
- Seputiene V, Povilonis J, Suziedeliene E. 2012. Novel variants of AbaR resistance islands with a common backbone in *Acinetobacter baumannii* isolates of European clone II. *Antimicrob Agents Chemother.*;56:1969–1973.

- Post V, White P, Hall R. 2010. Evolution of AbaR-type genomic resistance islands in multiply antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 1162–1170.
- Krizova L, Nemecek A. 2010. A 63 kb genomic resistance island found in a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolate of European clone I from 1977. *J Antimicrob Chemother.*;65:1915–1918.
- Hamidian M, & Hall R. 2011. AbaR4 replaces AbaR3 in a carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolate belonging to global clone 1 from an Australian hospital. *J Antimicrob Chemother*; 66: 2484–2491.
- Muñoz L & García P. 2010. DNA Transposons: Nature and Applications in Genomics. *Current Genomics*, 2010, 11, 115-128.
- Wright MS, Mountain S, Beeri K, Adams MD. 2017. Assessment of insertion sequence mobilization as an adaptive response to oxidative stress in *Acinetobacter baumannii* using IS-seq. *J Bacteriol* 199:e00833-16.
- Evans B & Sebastian G. 2014. OXA- β -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*: 27: 241–263.
- Segal H, Garny S, Elisha B. 2005. Is IS(ABA-1) customized for *Acinetobacter*? *FEMS Microbiol Lett.*;243:425–429.
- Figueiredo S, Poirel L, Croize J, Recule C, Nordmann P. 2009. In vivo selection of reduced susceptibility to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* related to ISAba1-mediated overexpression of the natural blaOXA-66 oxacillinase gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:2657– 2659.
- Evans BA, Hamouda A, Amyes SG. 2013. The rise of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Curr. Pharm. Des.* 19:223–238.
- Corvec S, Poirel L, Naas T, Drugeon H, Nordmann P. 2007. Genetics and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene blaOXA-23 in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:1530 –1533.
- Leski TA, Bangura U, Jimmy DH, Ansumana R, Lizewski SE, Li RW, Stenger DA, Taitt CR, Vora GJ. 2013. Identification of blaOXA-51-like, blaOXA-58, blaDIM-1, and blaVIM carbapenemase genes in hospital Enterobacteriaceae isolates from Sierra Leone. *J. Clin. Microbiol.* 51:2435–2438.
- Poirel L, Marque S, Heritier C, Segonds C, Chabanon G, Nordmann P. 2005. OXA-58, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:202–208.
- Poirel L, Nordmann P. 2006. Genetic structures at the origin of acquisition and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene blaOXA-58 in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:1442–1448.
- Ravasi P, Limansky AS, Rodriguez RE, Viale AM, Mussi MA. 2011. ISAba825, a functional insertion sequence modulating genomic plasticity and blaOXA-58 expression in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:917–920.

- Lee Y, Kim C-K, Lee H, Jeong SH, Yong D, Lee K. 2011. A novel insertion sequence, ISAb₁₀, inserted into ISAb₁ adjacent to the bla_{OXA}-23 gene and disrupting the outer membrane protein gene carO in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:361–363.
- Siguier P, *et al.* 2006 ISfinder the reference centre for bacterial insertion Sequences. *Nucleic Acids Res.* 34: D32-D36 and the database URL (<http://www-is.biotoul.fr>).
- Partridge, S.R., Kwong, S.M., Firth, N., Jensen, S.O., 2018. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 31 (4), e00088-1.
- Mugnier, P.D., Poirel, L., Naas, T., Nordmann, P., 2010. Worldwide dissemination of the bla_{OXA}-23 carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerg. Infect. Dis.* 16 (1), 35–40.
- Hamidian, M., Nigro, S.J., 2019. Emergence, molecular mechanisms and global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Microb. Genom.* 5 (10), e000306.
- Japoni-Nejad, A., Farshad, S., van Belkum, A., Ghaznavi-Rad, E., 2013. Novel cassette array in a class 1 integron in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from Central Iran. *Int. J. Med. Microbiol.* 303 (8), 645–650.
- Lee, Y.T., Huang, L.Y., Chen, T.L., Siu, L.K., Fung, C.P., Cho, W.L., Yu, K.W., Liu, C.Y., 2009. Gene cassette arrays, antibiotic susceptibilities, and clinical characteristics of *Acinetobacter baumannii* bacteremic strains harboring class 1 integrons. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 42 (3), 210–219.
- Betteridge T, Partridge R, Iredell R, Stokes H. 2011. Genetic Context and Structural Diversity of Class 1 Integrons from Human Commensal Bacteria in a Hospital Intensive Care Unit. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 3939–3943
- Pagano, M., Martins, A.F., Machado, A.B., Barin, J., Barth, A.L., 2013. Carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii* carrying the ISAb₁ upstream bla_{OXA}-51-like gene in Porto Alegre, southern Brazil. *Epidemiol. Infect.* 141 (2), 330–333.
- Fonseca EL, Freitas FD, Scheidegger EMD, Jacinto T, Vicente ACP. 2011. Class 2 integrons in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* circulating in different Brazilian geographic regions. *Int J Antimicrob Agents.* 2011;38:95–96.
- Mendes R, Castanheira M, Toleman MA, Sader H, Jones R, Walsh T. 2007. Characterization of an integron carrying bla_{IMP}-1 and a new aminoglycoside resistance gene: aac(6)-31, and its dissemination among genetically unrelated clinical isolates in a Brazilian hospital. *Antimicrob Agents Chemother.*;51:2611–2614.
- Fluit, A.C., Schmitz, F.J., 2004. Resistance integrons and super-integrons. *Clin. Microbiol. Infect.* 10 (4), 272–288.
- Martins N, Picao R, Adams S, Riley L, Moreira B. 2015. Association of class 1 and 2 integrons with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* international clones and *Acinetobacter nosocomialis* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.*;59:698–701.
- Filutowicz M, Dellis S, Levchenko I, Urh M, Wu F, York D .1994. Regulation of replication in an iteron-containing DNA molecule. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 68: 239-273.

- Bramhill D & Kornberg A .1988. A model for initiation at origins of DNA replication. *Cell* 54: 915-918.
- Snyder, L., & Snyder, L. 2013. *Molecular genetics of bacteria*. ASM Press.
- Gerdes K, Moller J, Bugge Jensen R. 2000. Plasmid and chromosome partitioning: surprises from phylogeny. *Molecular microbiology*.;37(3):455-66. PubMed PMID: 10931339
- Bignell C, Thomas C. 2001. The bacterial ParA-ParB partitioning proteins. *Journal of Biotechnology*. (91):1-34.
- Konieczny I, Bury K, Wawrzycka A, Wegrzyn K. 2014. Iteron plasmids. *Microbiol Spectrum* 2(6):PLAS-0026-2014.
- Bertini A, Poirel L, Mugnier PD, Villa L, Nordmann P, Carattoli A. 2010. Characterization and PCR-based replicon typing of resistance plasmids in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. Oct;54(10):4168-77. doi: 10.1128/AAC.00542-10. PMID: 20660691; PMCID: PMC2944597.
- Song S & Wood TK. 2020. A Primary Physiological Role of Toxin/Antitoxin Systems Is Phage Inhibition. *Front. Microbiol*. 11:1895. doi: 10.3389/fmicb.2020.01895.
- Unterholzner SJ, Poppenberger B, Rozhon W. 2013. Toxin-antitoxin systems: Biology, identification, and application. *Mobile Genetic Elements*; 3:e26219; <http://dx.doi.org/10.4161/mge.26219>.
- Songwei Ni, Baiyuan Li, Kaihao Tang, Jianyun Yao, Thomas K. Wood, Pengxia Wang, and Xiaoxue Wang. 2021. Conjugative plasmid-encoded toxin–antitoxin system PrpT/PrpA directly controls plasmidcopy number. *PNAS* 118:4.
- Mruk I, Kobayashi I. 2014. To be or not to be: regulation of restriction-modification systems and other toxin-antitoxin systems. *Nucleic Acids Res*; 42(1):70-86.
- Vasu K, & Nagaraja V. 2013. Diverse Functions of Restriction-Modification Systems in Addition to Cellular Defense. *MMBR.asrm.org*; 77 (1): 53-72.
- Couturier M, Bex F, Bergquist P, Maas W. 1988. *Identification and classification of bacterial plasmid*. *Microbiol Rev*;52(3):375-395.
- Smillie C, Garcillán-Barcia MP, Francia MV, Rocha EP, de la Cruz F. Mobility of plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2010 Sep;74(3):434-52. doi: 10.1128/MMBR.00020-10. PMID: 20805406; PMCID: PMC2937521.
- San Millan A. 2018. Evolution of Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance in the Clinical Context. *Trends in Microbiology*; 26(12):978-985. DOI: 10.1016/j.tim.2018.06.007. PMID: 30049587.
- Bouet J, Nordström K, Lane D. 2007. *Plasmid partition and incompatibility – the focus shifts*. *Mol Microbiol*;65(6):1405-1414.
- Garcillan-Barcia MP, Francia MV, de la Cruz F. 2009. The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbiol Rev* 33:657-687.

- Salto IP, Torres Tejerizo G, Wibberg D, Pühler A, Schlüter A, Pistorio M. 2018. Comparative genomic analysis of *Acinetobacter* spp. plasmids originating from clinical settings and environmental habitats. *Scientific Reports*;8(1): 7783.
- Partridge SR, Kwong SM, Firth N, Jensen SO. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev.* 2018 Aug 1;31(4):e00088-17. doi: 10.1128/CMR.00088-17. PMID: 30068738; PMCID: PMC6148190.
- Hamidian, M., Ambrose, S.J., Hall, R.M., 2016. A large conjugative *Acinetobacter baumannii* plasmid carrying the *sul2* sulphonamide and *strAB* streptomycin resistance genes. *Plasmid* 87–88, 43–50.
- Da Silva, G.J., Domingues, S. 2016. Insights on the horizontal gene transfer of carbapenemase determinants in the opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Microorganisms* 4(3), 29.
- Liu, S.Y., Lin, J.Y., Chu, C., Su, L.H., Lin, T.Y., Chiu, C.H. 2006. Integron-associated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* isolated from a regional hospital in Taiwan. *Int. J. Antimicrob. Agents* 27 (1), 81–84.
- Lee, M.H., Chen, T.L., Lee, Y.T., Huang, L., Kuo, S.C., Yu, K.W., Hsueh, P.R., Dou, H.Y., Su, I.J., Fung, C.P. 2013b. Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying *blaOXA-23* from hospitals in Central Taiwan. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 46 (6),419–424.
- Alattraqchi, A.G., Mohd Rani, F., NI, A.R., Ismail, S., Cleary, D.W., Clarke, S.C., Yeo, C.C. 2021. Complete genome sequencing of *Acinetobacter baumannii* AC1633 and *Acinetobacter nosocomialis* AC1530 unveils a large multidrug-resistant plasmid encoding the NDM-1 and OXA-58 carbapenemases. *mSphere* 6 (1), e01076-20

Complete Genome Sequence of a Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolate Obtained from a Mexican Hospital (Sequence Type 422)

Semiramis Castro-Jaimes,^a Abraham David Salgado-Camargo,^a Lucía Graña-Miraglia,^a Luis Lozano,^a Paola Bocanegra-Ibarias,^d Patricia Volkow-Fernández,^b Jesus Silva-Sanchez,^c Santiago Castillo-Ramírez,^a Miguel A. Cevallos^a

Centro de Ciencias Genómicas, Programa de Genómica Evolutiva, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, Mexico^a; Departamento de Enfermedades Infecciosas, Laboratorio de Microbiología, Instituto Nacional de Cancerología, Secretaría de Salud (SSA), Cuernavaca, Morelos, Mexico^b; Departamento de Diagnóstico Epidemiológico, Centro de Investigaciones sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Morelos, Mexico^c; Hospital Universitario de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, Mexico^d

***Acinetobacter baumannii* has emerged as a dangerous nosocomial pathogen, particularly for severely ill patients in intensive care units and patients with hematologic malignancies. Here, we present the complete genome sequence of a multidrug-resistant *A. baumannii* isolate, recovered from a Mexican hospital and classified as sequence type 422 according to the multilocus sequence typing Pasteur scheme.**

Received 5 May 2016 Accepted 10 May 2016 Published 23 June 2016

Citation Castro-Jaimes S, Salgado-Camargo AD, Graña-Miraglia L, Lozano L, Bocanegra-Ibarias P, Volkow-Fernández P, Silva-Sanchez J, Castillo-Ramírez S, Cevallos MA. 2016. Complete genome sequence of a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolate obtained from a Mexican hospital (sequence type 422). *Genome Announc* 4(3):e00583-16. doi:10.1128/genomeA.00583-16.

Copyright © 2016 Castro-Jaimes et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Miguel A. Cevallos, mac@ccg.unam.mx.

Acinetobacter baumannii is a Gram-negative bacterium that has emerged as a dangerous pathogen worldwide, causing a variety of nosocomial infections, especially in severely ill patients in intensive care units and patients with hematologic malignancies on chemotherapy (1). *A. baumannii* isolates are resistant to most of the currently used antibiotics, including carbapenems, and they are able to survive for extended periods of time under a broad range of environmental conditions, such as dry surfaces. These characteristics promote *A. baumannii* outbreaks in the hospital setting. Most of the isolates causing outbreaks worldwide belong to the international clonal lineages I and II (2), clonal complexes 1 and 2, respectively, as defined by the multilocus sequence typing (MLST) Pasteur scheme (3).

Here, we present the complete genome sequence and annotation of *A. baumannii* 3207, an isolate not related to the international clonal lineages but instead classified as sequence type 422 according to the MLST Pasteur scheme (3). This multidrug-resistant isolate was recovered from bronchoalveolar lavage fluid of a 45-year-old female patient admitted to the Hospital Universitario de Nuevo León, Mexico, a tertiary care center, in August 2008.

The complete genome of *A. baumannii* 3207 was determined on a PacBio RSII platform. To do this, a large insert library (20 to 25 kb) was constructed and sequenced, using one SMRT cell with a P6 polymerase and C4 chemistry combination (P6-C4) with a 180-min movie. The SMRT cells produced 551,632,314 post-filter polymerase reads with a mean read length of 10,718 bp. Subreads were assembled *de novo* using the PacBio RS hierarchical genome assembly process (HGAP) protocol version 3 in SMRT analysis version 2.3 (Pacific Biosciences) (4). To improve regions of low coverage, a library with a 2 × 300-bp paired-end configuration

was sequenced on an Illumina MiSeq platform. The sequencing yielded 3,117,310 reads, resulting in 909,042,928 bp. A hybrid assembly was constructed with the Illumina MiSeq reads and PacBio RII subreads using SPAdes version 3.5.0 (5). The contigs corresponding to the chromosome and the plasmids were circularized using a Perl script available at <https://github.com/jfass/apc>. Functional annotation was performed with the NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline.

The *A. baumannii* 3207 genome consists of a circular chromosome (3,998,013 bp) and two plasmids: pAba3207a (13,479 bp) and pAba3207b (80,547 bp). The chromosome has six rRNA operons, 74 tRNAs, and 3,674 coding sequences (CDSs) and embraces most of the antibiotic resistance genes, conferring resistance to aminoglycosides, beta-lactams, carbapenems (blaOXA-65), cephalosporins, fosmidomycin, fusaric acid, phenicols, and tetracyclines. The smallest plasmid has 19 CDSs, including one carbapenem resistance gene (blaOXA-58), whereas pAba3207b has 97 CDSs.

This and a previous report (6) are the first steps toward understanding the genomic diversity of *A. baumannii* in Mexico, not only at some loci but at the genome level. However, to get a more comprehensive picture, comparative analyses of many more isolates are warranted.

Nucleotide sequence accession numbers. The genome sequence of isolate 3207 was deposited in GenBank under the accession numbers CP015364, CP015365, and CP015366.

ACKNOWLEDGMENTS

PacBio sequencing was performed at the Duke GCB Genome Sequencing Shared Resource (Durham, NC, USA). Illumina sequencing was conducted at Macrogen, (Seoul, South Korea).

This work was supported by the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT, grant number IA200515. A.D.S.-C. and L.G.-M. are doctoral students from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), and received fellowships from CONACYT.

FUNDING INFORMATION

This research was funded by the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, PAPIIT (UNAM).

REFERENCES

1. Antunes LC, Visca P, Towner KJ. 2014. *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. *Pathog Dis* 71:292–301. <http://dx.doi.org/10.1111/2049-632X.12125>.
2. Zarrilli R, Pournaras S, Giannouli M, Tsakris A. 2013. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. *Int J Antimicrob Agents* 41:11–19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.09.008>.
3. Diancourt L, Passet V, Nemeč A, Dijkshoorn L, Brisse S. 2010. The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PLoS One* 5:e10034. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0010034>.
4. Chin CS, Alexander DH, Marks P, Klammer AA, Drake J, Heiner C, Clum A, Copeland A, Huddleston J, Eichler EE, Turner SW, Korlach J. 2013. Nonhybrid, finished microbial genome assemblies from long-read SMRT sequencing data. *Nat Methods* 10:563–569. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2474>.
5. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA. 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 19:455–477. <http://dx.doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>.
6. Graña-Miraglia L, Lozano L, Castro-Jaimes S, Cevallos MA, Volkow P, Castillo-Ramírez S. 2016. First genome sequence of a Mexican multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolate. *Genome Announc* 4(3):e00156-16. <http://dx.doi.org/10.1128/genomeA.00156-16>.



Complete Genome Sequence of a *bla*_{OXA-58}-Producing *Acinetobacter baumannii* Strain Isolated from a Mexican Hospital

Ángeles Pérez-Oseguera,^a Semiramis Castro-Jaimes,^a Abraham David Salgado-Camargo,^a Jesus Silva-Sanchez,^b Elvira Garza-González,^c Santiago Castillo-Ramírez,^a Miguel Ángel Cevallos^a

Programa de Genómica Evolutiva, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, Mexico^a; Grupo de Resistencia Bacteriana, Centro de Investigaciones Sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Mexico^b; Servicio de Gastroenterología, Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González, Nuevo León, Mexico^c

ABSTRACT In this study, we present the complete genome sequence of a *bla*_{OXA-58}-producing *Acinetobacter baumannii* strain, sampled from a Mexican hospital and not related to the international clones.

Acinetobacter baumannii is a pathogen responsible for numerous infections and outbreaks in the clinical environment, and it is a major cause of morbidity and mortality in Latin America and in the rest of the world (1, 2). The abilities of this organism to acquire antibiotic resistance genes, to form biofilms, and to resist desiccation facilitate its permanence in the hospital setting and promote the emergence of outbreaks. Most of the nosocomial outbreaks worldwide are produced by a limited group of strains belonging to the international clones I and II (3).

In the last decade, this organism has steadily increased its resistance to carbapenems, an alarming situation because those antibiotics are one of the last-resort drugs for treating infections. Resistance to carbapenems in *A. baumannii* has been linked to the production of six groups of carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamases: OXA-51-like, OXA-23-like, OXA-40/24-like, OXA-58-like, OXA-143-like, and OXA-235-like. Genes encoding OXA-51-like carbapenemases are encoded in the chromosome of almost all *A. baumannii* strains. The other five groups of carbapenemases are usually encoded within mobile genetic elements such as plasmids and transposons (4, 5).

A. baumannii strain 7804 was recovered in July 2006 from a bronchoalveolar lavage fluid specimen from a 25-year-old male patient admitted to the Hospital Universitario de Nuevo León, a tertiary care center (Nuevo León State, Mexico). A previous study showed that this strain is not susceptible to carbapenems and is not related to the international clones; it belongs to sequence type 490 (ST490) (Oxford scheme) and to clonal complex 110 (CC110) (6). The same study also indicated that this strain has an OXA-58-like gene associated with an ISAbA3 element (6).

The genome sequence of this strain was determined with two single-molecule real-time (SMRT) cells on a PacBio RSII platform. Subreads were assembled *de novo* using the RS hierarchical genome assembly process (HGAP) protocol version 3, in SMRT analysis version 2.3 (Pacific Biosciences). The assembly has 98 \times coverage. Unitigs corresponding to the chromosome and plasmids were circularized using a Perl script (available at <https://github.com/jfass/apc>). Functional annotation was done with the NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline. The genome of *A. baumannii* 7804 contains one circular chromosome (4,159,217 bp) and two plasmids, pAba7804a (12,381 bp) and pAba7804b (170,420 bp). The chromosome has 6 rRNA operons, 75 tRNAs, and 3,892

Received 27 July 2017 Accepted 31 July 2017 Published 7 September 2017

Citation Pérez-Oseguera Á, Castro-Jaimes S, Salgado-Camargo AD, Silva-Sanchez J, Garza-González E, Castillo-Ramírez S, Cevallos MA. 2017. Complete genome sequence of a *bla*_{OXA-58}-producing *Acinetobacter baumannii* strain isolated from a Mexican hospital. *Genome Announc* 5:e00949-17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00949-17>.

Copyright © 2017 Pérez-Oseguera et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Miguel Ángel Cevallos, mac@ccg.unam.mx.

coding sequences (CDS). The acquired antibiotic resistance genes were identified via ResFinder 2.1 (7) with the following results: the chromosome embraces one gene encoding aminoglycoside resistance *aph(3')-Via* and two genes encoding β -lactamases genes (*bla_{ADC-25}* and *bla_{OXA-64}*). Plasmid pAba7804b carries two genes related to aminoglycosid resistance (*strA* and *strB*), one sulfonamide resistance gene (*sul2*), and another gene related to tetracycline resistance (*tetB*). The *bla_{OXA-58}* gene is carried in the small plasmid. Two recently published genomes (8, 9) along with this strain represent the first *A. baumannii* genome sequences from Mexico and should be instrumental in the characterization of the genomic diversity of this nosocomial pathogen in this country.

Accession number(s). The genome sequence of isolate 7804 was deposited in GenBank under the accession numbers CP022283, CP022284, and CP022285.

ACKNOWLEDGMENTS

We are very grateful to Gabriela Guerrero for her bioinformatics assistance. PacBio sequencing was performed at the Yale Center for Genome Analysis (YCGA).

This work was supported by the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT (grant number IA201317). A.D.S.-C. and S.C.-J. are doctoral students from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowships from CONACYT. This study was supported by grants from CONACYT (Mexican Council for Science and Technology grant number 256927, SEP/Basic Science CONACYT 2015).

REFERENCES

1. Antunes LC, Visca P, Towner KJ. 2014. *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. *Pathog Dis* 71:292–301. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12125>.
2. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. 2008. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev* 21:538–582. <https://doi.org/10.1128/CMR.00058-07>.
3. Zarrilli R, Poumaras S, Giannouli M, Tsakris A. 2013. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. *Int J Antimicrob Agents* 41:11–19. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.09.008>.
4. Potron A, Poirel L, Nordmann P. 2015. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Int J Antimicrob Agents* 45:568–585. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.03.001>.
5. Evans BA, Amyes SG. 2014. OXA β -lactamases. *Clin Microbiol Rev* 27:241–263. <https://doi.org/10.1128/CMR.00117-13>.
6. Gonzalez-Villoria AM, Tamayo-Legorreta E, Garza-Ramos U, Barrios H, Sanchez-Pérez A, Rodríguez-Medina N, Uribe-Aviña N, Cevallos MA; CRAB Study Group, Silva-Sanchez J, Silva-Sanchez J. 2016. A multicenter study in Mexico finds *Acinetobacter baumannii* clinical isolates belonging to clonal complexes 636B (113B) and 92B harboring OXA-72, OXA-239, and OXA-469. *Antimicrob Agents Chemother* 60:2587–2588. <https://doi.org/10.1128/AAC.02042-15>.
7. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, Aarestrup FM, Larsen MV. 2012. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother* 67:2640–2644. <https://doi.org/10.1093/jac/dks261>.
8. Graña-Miraglia L, Lozano L, Castro-Jaimes S, Cevallos MA, Volkow P, Castillo-Ramírez S. 2016. First genome sequence of a Mexican multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolate. *Genome Announc* 4(2):e00156-16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00156-16>.
9. Castro-Jaimes S, Salgado-Camargo AD, Graña-Miraglia L, Lozano L, Bocanegra-Ibarias P, Volkow-Fernández P, Silva-Sanchez J, Castillo-Ramírez S, Cevallos MA. 2016. Complete genome sequence of a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolate obtained from a Mexican hospital (sequence type 422). *Genome Announc* 4(3):e00583-16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00583-16>.