

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ALTERACIONES GENOTÍPICAS Y FENOTÍPICAS DE *ACINETOBACTER*
BAUMANNII EN PRESENCIA DE OXACILINA INDUCTORA DE
BETALACTAMASAS OXA

POR

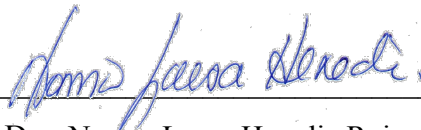
LIC. FRIDA GUERRERO LÓPEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

2025

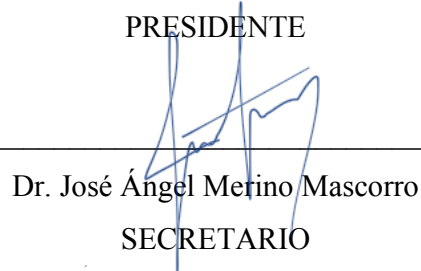
ALTERACIONES GENOTÍPICAS Y FENOTÍPICAS DE *Acinetobacter*
baumannii INDUCTORAS DE BETALACTAMASAS OXA EN
PRESENCIA DE OXACILINA

Comité de Tesis



Dra. Norma Laura Heredia Rojas

PRESIDENTE



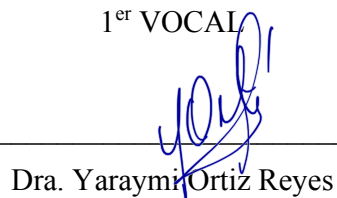
Dr. José Ángel Merino Mascorro

SECRETARIO



Dr. José Santos García Alvarado

1^{er} VOCAL



Dra. Yaraymi Ortiz Reyes

2^{do} VOCAL



Dr. Eduardo Franco Frías

3^{er} VOCAL



Dra. Katiushka Arevalo Niño

Subdirección de Posgrado



SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. bajo la dirección de la Dra. Norma Heredia Rojas. Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México.

AGRADECIMIENTOS

Gracias de corazón:

A mi familia por el apoyo que siempre me han dado y creer en mí.

A mi Fer por darme felicidad, cariño y ser un pilar en cada etapa de nuestra vida.

A la Dra. Yaraymi, por ser una guía paciente en toda esta etapa.

A la Dra. Norma y el Dr. Santos por recibirme en su laboratorio y haberme dado la oportunidad de trabajar de mano a su guía.

A mi amore que me dio siempre un lugar para apoyarme y ser sincera con la vida.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León y a CONACYT por darme la oportunidad de ampliar mis horizontes.

DEDICATORIA

A mi familia por creer y apoyar mi crecimiento.

A mi Esposo que me ayudo en más de un sentido para llegar hasta el final.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIA	v
ÍNDICE	vi
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	xii
1. RESUMEN	1
1. ASBTRACT	2
2. INTRODUCCIÓN	3
3. ANTECEDENTES	5
3.1. Generalidades del género <i>Acinetobacter</i>	5
3.2. Perspectiva histórica	5
3.3. Epidemiología	6
3.4. Patogenia	8
3.5. Factores de virulencia	9
3.6. Formación de biopelículas	10
3.7. Producción de exopolisácaridos	11
3.8. Movilidad	12
3.9. Capacidad de transformación	12
3.10. Resistencia a antibióticos	13
3.11. Interacción de proteínas in silico: resistencia a antimicrobianos y factores de virulencia	16
3.12. Antibióticos utilizados para evaluar virulencia bacteriana	17

4. JUSTIFICACIÓN	19
5. HIPÓTESIS	20
6. OBJETIVOS	21
6.1. Objetivo General.	21
6.2. Objetivos específicos.	21
7. MATERIAL Y MÉTODOS	22
7.1. Antimicrobiano	22
7.2. Concentración mínima bactericida (CMB)	23
7.3. Determinación de la viabilidad	23
7.4. Ensayos de motilidad	23
7.4.1. Ensayo de movilidad de tipo Twitching	23
7.4.2. Ensayo de motilidad tipo Swarming	24
7.5. Cuantificación de exopolisácaridos	24
7.6. Determinación del índice de formación de biopelícula (del inglés BFI)	24
7.7. Evaluación de la capacidad de transformación	25
7.7.1. Extracción de plásmidos <i>pTargetF</i>	25
7.7.2. Amplificación de las secuencias esp de los plásmidos	26
7.7.3. Ensayo de transformación	27
7.8. Análisis de expresión génica	27
7.9. Análisis estadístico	29
8. RESULTADOS	30
8.1. Concentración mínima bactericida	30
8.2. Efecto de la concentración sub-inhibitoria de la oxacilina sobre el crecimiento de las cepas de <i>A. baumannii</i>	30
8.3. Efecto de la concentración sub-inhibitoria de la oxacilina sobre la motilidad tipo twitching y swarming de las cepas de <i>A. baumannii</i>	31

8.4. Efecto de la concentración sub-inhibitoria de la oxacilina sobre la producción total de exopolisácaridos de las cepas de <i>A. baumannii</i>	32
8.5. Efecto de la concentración sub-inhibitoria de la oxacilina sobre el índice de formación de biopelícula de las cepas de <i>A. baumannii</i>	33
8.6. Efecto de la concentración sub-inhibitoria de la oxacilina sobre los ensayos de transformación de las cepas de <i>A. baumannii</i>	36
8.7. Análisis genético de <i>A. baumannii</i> con concentración sub-inhibitoria de oxacilina	41
8.7.1. Expresión de genes relacionados a la motilidad.....	41
8.7.2. Expresión de genes relacionados al índice de formación de biopelícula	42
9. DISCUSIÓN	46
10. CONCLUSIONES	50
11. BIBLIOGRAFÍA	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Página
1	Mecanismos de resistencia a antibióticos por <i>A. baumannii</i> .	14
2	Interpretación de formación de biopelícula (García-Heredia et al., 2013).	25
3	Cebadores para la amplificación de secuencias de plásmidos de resistencia a antibióticos	26
4	Cebadores para el análisis de expresión génica relacionada a los ensayos.	29
5	CMB de cepas de <i>A. baumannii</i> en presencia de oxacilina	30
6	Viabilidad de <i>A. baumannii</i> en presencia de oxacilina	31
7	Motilidad tipo twitching y swarming de la cepa ATCC BAA 2093	32
8	Cuantificación de producción total de exopolisácaridos de la cepa de <i>A. baumannii</i> ATCC 19606. Y ATCC BAA 2093	33
9	IFB de la cepa de <i>A. baumannii</i> ATCC 19606 Y ATCC BAA 2093	34
10	Eficiencia de transformación de <i>A. baumannii</i> ATCC 19606 Y ATCC BAA 2093 en relación a la viabilidad bacteriana en el periodo de tiempo de preexposición de las diferentes concentraciones de oxacilina	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Tabla	Titulo	Página
1	Factores de virulencia asociados a la supervivencia de las bacterias: proteínas Omp (proteínas de membrana externa: formación de biopelículas), OMV (vesículas portadoras de genes de resistencia), CPS y LPS (integridad de la membrana, endotoxina), T6SS (competencia intraespecies), sideróforos (proteínas para la adquisición de metales, fuente de la imagen: Fei.Ju et al., 2018)	9
2	Representación esquemática del desarrollo de biopelículas sobre una superficie sólida (Fuente de la imagen: Moura et al., 2017)	10
3	Asociaciones de proteínas en relación a blaOXA-69 en <i>A. baumannii</i> (Fuente de la imagen: string-db.org)	17
4	Efecto de la pre-exposición a concentraciones sub-inhedoras de oxacilina sobre la motilidad tipo twitching por 1 h y swarming por 2 h de la cepa <i>A. baumannii</i> ATCC BAA2093, donde se muestran la mayor diferencias	35
5	Eficiencia de transformación con secuencia de ADN o plásmido en relación a la viabilidad bacteriana en el periodo de tiempo de preexposición de las diferentes concentraciones de oxacilina A) <i>A. baumannii</i> ATCC 19606 transformadas acorde a la viabilidad de las células B) <i>A. baumannii</i> ATCC BAA 2093 transformadas acorde a la viabilidad de las células	36
6	Expresión de los genes relacionados a la motilidad tipo twitching (<i>pilA</i> y <i>tonB</i>) de <i>A. baumannii</i> ATCC BAA 2093 por preexposición a oxacilina, A) 1 h de preexposición, B) 2h de preexposición. El gen constitutivo fue el 16S.	41
7	Expresión de los genes relacionados a la motilidad tipo swarming (<i>ddc</i> y <i>dat</i>) de <i>A. baumannii</i> ATCC BAA 2093 en relación al tiempo de preexposición a los tratamientos con oxacilina, A) 1 h de preexposición, B) 2 h de preexposición. El gen constitutivo fue el 16S.	42

8	Expresión de los genes relacionados a IFB (oxa y csuE) de <i>A. baumannii</i> ATCC 19606 en relación al tiempo de preexposición de oxacilina y exposición en el ensayo de IFB, A) 2 h, con el ensayo a nula concentración, B) 2 h, con el ensayo a igual concentración, C) 6 h, con el ensayo a nula concentración, D) 6 h, con el ensayo a igual concentración	44
9	Expresión de los genes relacionados a IFB (oxa y csuE) de <i>A. baumannii</i> ATCC BAA 2093 en relación al tiempo de preexposición de oxacilina y exposición en el ensayo de IFB, A) 2 h, con el ensayo a nula concentración, B) 2 h, con el ensayo a igual concentración, C) 6 h, con el ensayo a nula concentración, D) 6 h, con el ensayo a igual concentración	45

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.

°C	Grados Celsius
µg	Microgramo
AFLP	del inglés Polimorfismo de longitud de fragmento amplificado
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARDRA	Análisis de restricción de ADN ribosómico amplificado
ARN	Ácido ribonucleico
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
ATCC	del inglés American Type Culture Collection
<i>bla-OXA</i>	Enzima oxacilinas, protección contra antibióticos β-lactámicos
CMB	Concentración mínima Bactericida
EPS	Exopolisácaridos
esp	Espectinomicina
h	Hora
ICC	Infusión cerebro corazón
Kb	Kilobase
LB	Luria bertani
LBNS	Luria Bertani sin sales
M	Molar
mg	Miligramo
min	Minutos
ml	Mililitro
mM	Milimolar
nm	Nanómetros
pb	Pares de bases
PBS	del inglés Buffer fosfato salino
PCR	del inglés Reacción en Cadena de la Polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	del inglés Transcripción inversa de la reacción en cadena de la polimerasa
s	Segundos
sub-CMB	Por debajo de la Concentración Mínima Bactericida
TBS	del inglés medio de digerido de soja y caseína
UFC	Unidad formadora de colonia
V	Voltios

1. RESUMEN

En las últimas décadas se ha observado un incremento significativo en la diseminación de genes de resistencia a antibióticos. Los genes son útiles para los microorganismos para evadir y/o contrarrestar la acción de los antimicrobianos. En ese sentido, la producción de variantes de β -lactamasas bacterianas, para inhibir la actividad de los β -lactámicos, constituye una problemática para la salud pública. Existen estudios que demuestran una alteración en la expresión de los factores de virulencia, donde se ha reportado una exacerbación en la producción de biopelícula, en motilidad de las bacterias y capacidad de transformación al estar expuestos a concentraciones subletales de antibióticos. Por esa razón, en el presente trabajo se utilizó el modelo de *A. baumannii* oxacilina (OXA) resistente en medio TBS con ensayos donde se retaron a las cepas en concentraciones de 0.25, 0.5 y 1.0 mg/ml de OXA por diferentes periodos de tiempo dependiendo del ensayo para determinar 1) viabilidad por método de cuenta en placa; 2) movilidad twitching y swarming en agar LB sin sal y agar suave respectivamente; 3) cuantificación química de producción total de exopolisacaridos; 4) índice de formación de biopelículas en placas de 96 pozos; 5) capacidad de transformación a ADN exógeno en forma de plásmidos y secuencias con resistencia antimicrobiana a espectinomicina; 6) análisis de la expresión de genes relacionados a los anteriores factores de virulencia. Al exponer las cepas a las diferentes concentraciones de OXA se vio afectada la viabilidad, motilidad, producción de exopolisacaridos, el índice de formación de biopelícula, la capacidad de transformación y la expresión de genes relacionados. Nuestros resultados indican que las concentraciones sub-inhibitorias de OXA pudieron influir en la respuesta fenotípica y genotípica de las cepas, además de demostrar que las cepas respondieron de manera diferente a los ensayos.

1. ASBTRACT

In recent decades, a significant increase in the dissemination of antibiotic resistance genes has occurred. These genes are useful for microorganisms to evade and/or counteract the action of antimicrobials. In this sense, the production of bacterial β -lactamase variants to inhibit the activity of β -lactams constitutes a public health problem. Studies have shown an alteration in the expression of virulence factors, where an exacerbation in biofilm production, bacterial motility, and transformation capacity has been reported when exposed to sublethal concentrations of antibiotics. For this reason, in the present study, the model of *A. baumanniii* oxacillin (OXA)-resistant in TBS medium was used with assays that challenged the strains at concentrations of 0.25, 0.5, and 1.0 mg/ml of OXA for different periods of time depending on the assay to determine 1) viability by plate count method; 2) twitching and swarming motility in LB without salt and soft agar, respectively; 3) chemical quantification of total exopolysaccharide production; 4) biofilm formation index in 96-well plates; 5) transformation capacity to exogenous DNA in the form of plasmids and sequences with spectinomycin antimicrobial resistance; 6) analysis of gene expression related to the aforementioned virulence factors. Exposure of the strains to different OXA concentrations affected viability, motility, exopolysaccharide production, biofilm formation index, transformation capacity, and related gene expression. Our results indicate that sub-inhibitory concentrations of OXA could influence the phenotypic and genotypic response of the strains, in addition to demonstrating that the strains responded differently to the assays.

2. INTRODUCCIÓN

Acinetobacter es un patógeno bacteriano ubicuo en el medio ambiente, sin embargo, su capacidad de infectar a huéspedes sanos y la propensión que tiene a desarrollar resistencia a los antibióticos es preocupante. Amorim y Nascimento, (2017) han reportado un aumento de la mortalidad y la tasa de infección causada por *A. baumannii* multirresistente. La OMS desde 1998 declaró a *A. baumannii* como un problema a la salud pública y actualmente se encuentra clasificada en el nivel máximo de peligro (Prioridad 1: crítica) en infecciones humanas por los pocos tratamientos disponibles.

En las últimas décadas *Acinetobacter* se ha aislado de diversas fuentes de alimentos humanos, tanto en materia vegetal como animal, los que podrían considerarse como reservorios para la infección (Carvalho *et al.*, 2017; Carvalho *et al.* 2020; Elbehiry *et al.*, 2021; Rooney *et al.*, 2016). Su potencial patogénico es alto, puede colonizar, adherirse y formar biopelículas en distintos ambientes, poseer alta resistencia a los antimicrobianos, plasticidad génica y la capacidad de adquirir material genético de géneros no relacionados, haciéndola como consecuencia una bacteria difícil de controlar (Tavakol *et al.*, 2018).

Estudios previos indican que la exposición de *E. coli* O104:H4 a concentraciones subinhibitorias de rifaximina, alteraron la expresión fenotípica de factores de virulencia como movilidad tipo swarming, producción de Shiga toxina 2a, formación de biopelículas y expresión de genes relacionados (Benisty *et al.*, 2015; García-Heredia *et al.*, 2016; Kaplan, 2011). Los resultados motivaron a estudiar el comportamiento virulento de *E. coli* O104:H4, cuando es expuesto a concentraciones subletales de antibióticos a los cuales es resistente. En este contexto se utilizó la ampicilina para demostrar que en dosis bajas puede inducir la producción de β -lactamasas, las cuales, a su vez interactúan con rutas metabólicas relacionadas a virulencia, apareciendo como incógnita entonces ¿Puede *A. baumannii* productor β -lactamasas OXA, alterar su fenotipo y genotipo, por la presencia de concentraciones no letales de OXA?

La situación propuesta en este trabajo es un escenario real en la actualidad, dado por el uso indiscriminado de los antibióticos, en el ser humano y en los animales dirigidos

al consumo. Se conoce que *Acinetobacter* ha mostrado un aumento en los mecanismos de resistencia en cepas ambientales (Al Atrouni *et al.*, 2016), sin embargo, aún no conocemos con exactitud ¿dónde? ¿cuándo? y ¿a qué concentración? pueda estar expuesto y si esto presenta un riesgo en la salud pública o la seguridad alimentaria. Con la intención de responder algunas de estas incógnitas, nos hemos propuesto como objetivo en la presente investigación, caracterizar los cambios fenotípicos y genotípicos en *A. baumannii* resistente a OXA expuesto a concentraciones del mismo antibiótico inductoras de β -lactamasas OXA.

3. ANTECEDENTES

3.1. Generalidades del género *Acinetobacter*

Es un género compuesto por bacilos o cocobacilos no pigmentados, Gram negativos del filo proteobacteria. Son bacterias aerobias estrictas, no móviles, oxidasa-negativa, indol-negativo, catalasa-positivo, no fermentadoras, no forman esporas, y con un porcentaje de G+C que va del 38 al 47% (Brady *et al.*, 2021; Chapartegui-González *et al.*, 2018; Rada Cuentas, 2016). La morfología variada del género se ve asociada a su fase de crecimiento; el tipo bacilo (1.5 y 2.5 μm) se encuentra predominantemente en la fase logarítmica, y en la fase estacionaria se vuelven más cortos teniendo una morfología de cocobacilos (1 y 1.5 μm). Además, pueden variar en el tamaño y disposición ya que se han llegado a observar agrupados de manera diploide o en cadena (Bergogne-Bérézin & Towner, 1996; Salazar & Nieves, 2005).

La mayoría de las especies pertenecientes a *Acinetobacter* crecen de 20-44°C aunque el rango de temperatura de crecimiento descrito para la especie varía de 30-42°C. Las bacterias de este género crecen en medios comunes, sin requerimientos nutricionales especiales y con una única fuente de carbono (acetato, lactato o piruvato), además pueden crecer con amoníaco como única fuente de nitrógeno, aunque son incapaces de desnitrificar (Nemec *et al.*, 2010; Peleg *et al.*, 2008; Vanegas-Múnera *et al.*, 2014). El potencial de este microorganismo de aprovechar distintas fuentes de carbono y su capacidad para formar biopelículas en superficies bióticas y abióticas, lo ayuda a tener una supervivencia alta en distintas condiciones medioambientales estresantes (Bergogne-Bérézin & Towner, 1996; Jawad *et al.*, 1996; Rodríguez *et al.*, 2016). En comparación con otras bacterias Gram negativas, *Acinetobacter* puede sobrevivir en un ambiente de desecación y en condiciones abióticas, donde la producción de xilanasas para degradar sustancias complejas como la hemicelulosa son un factor clave (Al Atrouni *et al.*, 2016).

3.2. Perspectiva histórica

El género *Acinetobacter* ha tenido una historia de varios cambios taxonómicos y por lo menos le fueron asignados 15 nombres distintos (López & López-Brea, 2000);

Beijerinck, (1911) describió por primera vez un microorganismo y lo llamó *Micrococcus calcoaceticus* ya que lo observó en un mineral en el que predominaba el acetato de calcio, Brisou y Prévot fueron quienes identificaron el género *Acinetobacter* (del griego ακινητος=inmóvil) en 1954. En 1971 se limitó al género *Acinetobacter* por el subcomité sobre taxonomía de *Moraxella* y bacterias relacionadas a bacterias Gram negativas, inmóviles, oxidasa negativas. Fue hasta 1974 que se publicó en el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* el género *Acinetobacter*, aunque con una sola especie descrita *Acinetobacter calcoaceticus* (Baumann, 1968; Hernández, *et al.*, 2010; Lautrop, 1974; Peleg, *et al.*, 2008). Bouvet y Grimont en 1986, con base en estudios de hibridación de ADN-ADN pudieron distinguir 12 genoespecies de *Acinetobacter*.

Con el avance de las técnicas de hibridación de ADN y análisis como: restricción génica 16S rARN amplificado (ARDRA), alta resolución por polimorfismo de longitud de fragmento amplificado (AFLP), ribotyping, huellas dactilares del espaciador de ARNt, análisis de secuencia de la región espaciadora del gen ARNr 16S–23S y secuenciación del gen *rpoB* y sus espaciadores flanqueantes- (Howard *et al.*, 2012) se observó que algunas de las genoespecies resultaron ser sinónimas. En ese sentido, se permitió extender en 2008 el género a 31 especies genómicas válidas (EGV, 17 con nombre válido y el resto con número asignado). En julio de 2021 según la compilación del Dr. Alexander Nemec, se declaró que este género tiene 64 EGV (<https://apps.szu.cz/anemec/Classification.pdf>) aisladas de diferentes sitios. Cabe mencionar que el término EGV, es para las especies que se encuentran publicadas en *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, la revista oficial del *International Committee on Systematics of Prokaryotes* (Bouvet & Grimont, 1986; Peleg, *et al.*, 2008).

3.3. Epidemiología

El género *Acinetobacter* se encuentra ampliamente distribuido en el mundo, por ello se considera ubicuo (Baumann, 1968), de hecho, Cray *et al.* (2013) lo consideraron como “maleza microbiana”. Estas bacterias oportunistas llegan a formar parte de la microbiota dérmica humana, en especial en las regiones donde esta se mantiene más húmeda (axila, ingle, dedos, frente y orejas, Martínez-Pellús *et al.*, 2002; Seifert *et al.*, 1997). Entre las décadas de 1960 y 1970 se vieron en incremento las infecciones por

Acinetobacter spp. Especialmente en pacientes en cuidados intensivos, aunque al principio estas infecciones contaban con una baja virulencia, está fue aumentando y agravando las mismas infecciones (Aguilera-Calzadilla *et al.*, 2019; Zarrilli *et al.*, 2021). Actualmente *Acinetobacter* se reconoce como una “superbacteria” resistente a antibióticos (Tavakol *et al.*, 2018). Las bacterias de este género se han recuperado de suelo, agua, e incluso 7 especies (*A. baylyi*, *A. bouvetii*, *A. grimontii*, *A. tjernbergiae*, *A. townneri*, *A. tandoii* y *A. gernerii*) fueron descubiertas en aguas residuales de una planta de lodos activados en Australia (Carr *et al.*, 2003). De igual manera se han aislado en humanos las especies *A. parvus*, *A. schindleri*, *A. ursingii*, *A. beijerinckii* y *A. gyllenbergii* (Nemec *et al.*, 2001; Nemec *et al.*, 2009).

Un estudio realizado por el Centro Médico Naval Nacional de Estados Unidos (2007-2008), donde se aislaron microorganismos procedentes de biopsias de tejidos blandos de individuos que formaban parte de las tropas en Afganistán e Irak, se determinó que de los aislados, el 63% correspondió a *A. baumannii*. Además, se observó que esta bacteria infectaba a las personas más heridas o con alguna comorbilidad, así mismo se asociaron los contagios al uso de equipo médico contaminado (Sheppard *et al.*, 2010). Aunque es difícil atribuirle una mortalidad directa, al 2021 la CDC presentó un informe donde *A. baumannii* estuvo involucrada en 7300 casos de infección y aproximadamente 500 decesos (Elbehiry *et al.*, 2021). Los pacientes con sintomatología de infección por *Acinetobacter* son pocos, y es probable que los datos estén subestimados. Por ello cuando se observa un brote, es probable que la colonización de la bacteria se haya extendido a un gran número de individuos como reservorios de la bacteria (Joly-Guillou, 2005). Tan solo en el 2007 Young *et al.*, reportaron costos de entre \$5,600-30,000 dólares por caso registrado, siendo un impacto económico significativo para el paciente o los sistemas de salud.

La red nacional de seguridad de la atención médica en los Estados Unidos, reportó de 2009-2010 que *Acinetobacter* spp. fue el causante del 1.8% de las infecciones asociadas a la atención médica, lo que concuerda con datos de Europa y Latinoamérica, mientras que, en China, Tailandia, Taiwán, Vietnam y algunos países de América del Sur, se observó una proporción mayor de infecciones nosocomiales (Wong *et al.*, 2017).

Estas bacterias pueden encontrarse como reservorios en varios tipos de alimentos (Amorim & Nascimento, 2017), como lechuga (Rooney *et al.*, 2016), manzana, melón, frijol, repollo, coliflor, zanahoria, papa, rábano, pepino, pimienta, hongos, maíz dulce, melocotón, pera y fresa (Berlau, *et al.*, 1999; Ruimy *et al.*, 2010), carne cruda de res, cerdo, pollo, pavo, oveja y camello (Carvalho *et al.*, 2017; Carvalho *et al.* 2020; Elbehiry *et al.*, 2021; Elnar *et al.*, 2020; Han *et al.*, 2020; Jiayuan *et al.*, 2021), verduras locales en Hong Kong, pescado (Houang, *et al.*, 2001, Brahmi *et al.*, 2016), arroz (Chaudhary, *et al.* 2012), pez globo (Das *et al.* 2021), piscifactorías (Wong *et al.*, 2017) leche cruda (Nemec, *et al.*, 2010; Vaz-Moreira *et al.*, 2014) queso fresco (Amorim & Nascimento, 2017) y ensaladas de vegetales (Hamilton-Miller & Shah, 2001); sin embargo, aún no está claro si estos aislados hacen referencia a un reservorio natural o si bien es un reflejo del contacto humano y/o animales infectados (Hernández *et al.*, 2010).

3.4. Patogenia

En humanos las infecciones por *Acinetobacter* incluyen neumonía, endocarditis, meningitis, infecciones en la piel y heridas, infección de vías urinarias (IVU) y bacteriemia (Tavakol *et al.*, 2018). La tasa de mortalidad es muy variada, Joly-Guillou (2005) reportó que era entre 20 y 60% debido a que la mayoría de los individuos que adquieren una infección por *Acinetobacter* cuenta ya con alguna enfermedad subyacente o con comorbilidades. El paciente, aunque se encuentre inmunocomprometido será expuesto a la presión de colonización, tratamientos con antibióticos de amplio espectro (o de manera empírica), ruptura de barreras epiteliales, que de igual manera pueden comprometer al individuo a la colonización por *Acinetobacter* spp. (Maragakis & Perl, 2008).

La mayoría de las “oportunidades” de *Acinetobacter* se dan por la alteración normal de la microbiota del individuo y/o defensas anatómicas (Wong *et al.*, 2017); las cepas de *A. baumannii* son las que se han encontrado mayormente como causantes de infección en humanos, y pueden llegar a cualquier sistema del organismo (Gordon & Wareham, 2010). Pueden causar algunas patologías graves como 1) neumonía adquirida en el hospital y 2) neumonía adquirida en la comunidad (Howard *et al.*, 2012), 3) bacteriemia (Vanegas-Múnera *et al.*, 2014; Wisplinghoff *et al.*, 2004), 4) afecciones en

vías urinarias (Pedraza *et al.*, 1993; Rada Cuentas, 2016), 5) meningitis (Howard *et al.*, 2012; Metan *et al.*, 2007), 6) endocarditis (Rizos *et al.*, 2007; Starakis *et al.*, 2006) y 7) infecciones dérmicas y de tejidos blandos (Bang *et al.*, 2000).

3.5. Factores de virulencia

Los factores de virulencia son mecanismos adaptativos para responder y adaptarse al medio, permitiendo e incluso aumentar la capacidad de supervivencia (Cárdenas-Perea *et al.*, 2014); incluyen proteínas secretadas, como toxinas y enzimas; estructuras de la superficie celular, como polisacáridos capsulares, lipopolisacáridos y proteínas de la membrana externa; muchos genes codifican para factores de virulencia, como mecanismos de secreción, sideróforos, catalasas, reguladores, etc. (Chen, 2004).

Acinetobacter cuenta con distintos factores de supervivencia (Figura 1), tanto en el huésped como en el medio ambiente entre los que se conocen: la formación de biopelículas, movimiento tipo swarming y de tipo twitching y capacidad de transformación.

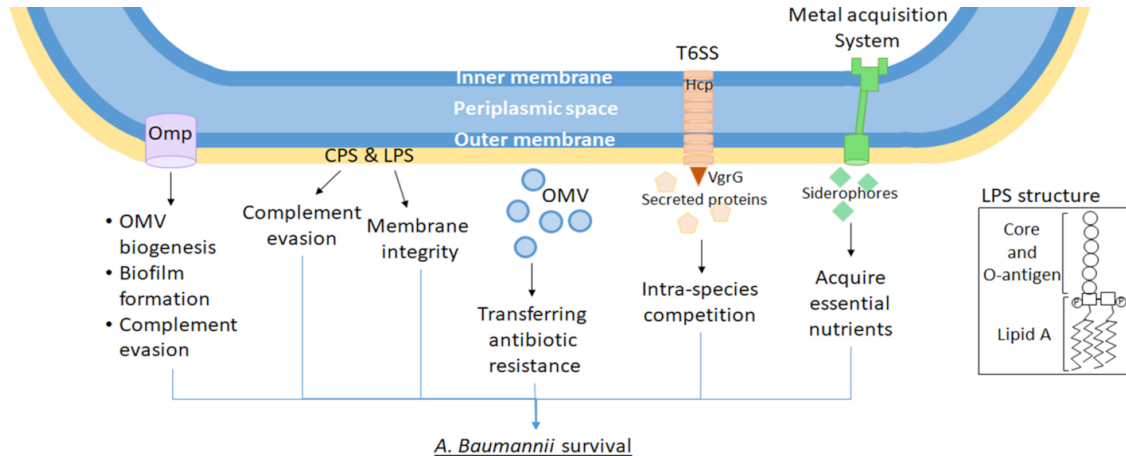


Figura 1. Factores de virulencia asociados a la supervivencia de las bacterias: proteínas Omp (proteínas de membrana externa: formación de biopelículas), OMV (vesículas portadoras de genes de resistencia), CPS y LPS (integridad de la membrana, endotoxina), T6SS (competencia intraespecies), sideróforos (proteínas para la adquisición de metales, fuente de la imagen: Fei.Ju *et al.*, 2018).

3.6. Formación de biopelículas

Las biopelículas son comunidades de microorganismos con una arquitectura altamente estructurada; se compone en su mayor parte por matriz extracelular, exopolisacáridos como la celulosa, proteínas, enzimas, lípidos y DNA, que se depositan en las superficies permitiendo la unión bacteriana (Chenoweth & Saint, 2016). Típicamente, las biopelículas se componen de una sola especie de microorganismos, aunque biopelículas multiespecie también son posibles (Chenoweth & Saint, 2016). La formación de la biopelícula según Moura *et al.* (2017) inicia con la adherencia reversible de bacterias planctónicas en una superficie acondicionada, que representa un ambiente rico en nutrientes que estimula la congregación celular (Fig. 2A). Posteriormente se desarrolla la fijación irreversible de células, producción de exopolisacáridos y formación de microcolonias (B), seguido de una biopelícula madura con un aumento de la densidad y complejidad general (C). La última etapa se caracteriza por el desprendimiento de células planctónicas y agregados de biopelícula, que son capaces de colonizar otras áreas (D).

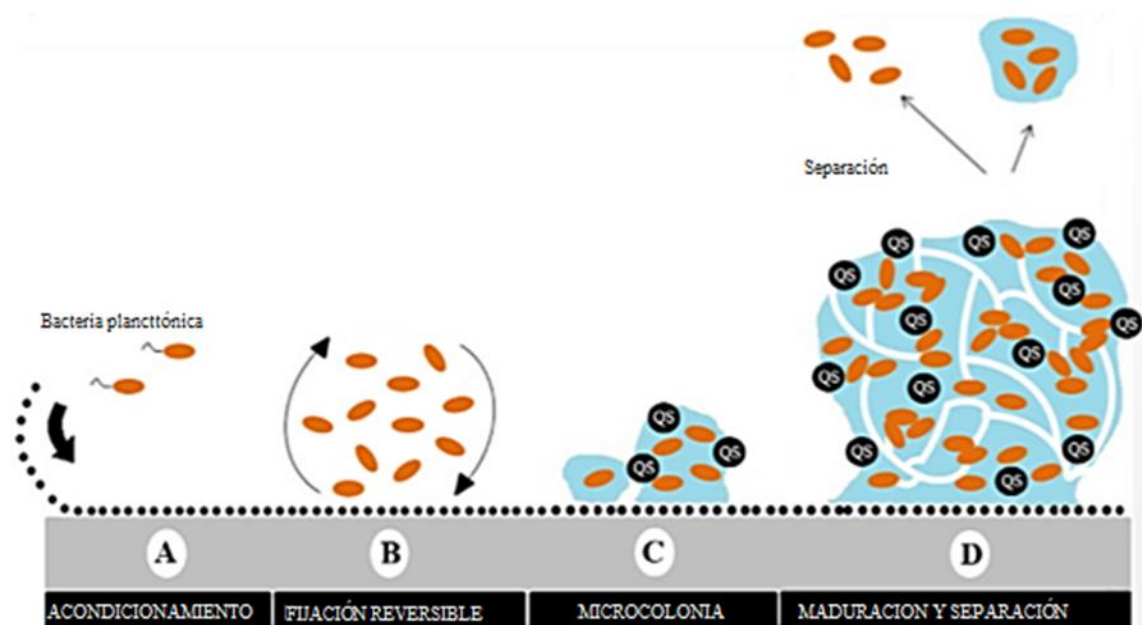


Figura 2. Representación esquemática del desarrollo de biopelículas sobre una superficie sólida (Fuente de la imagen: Moura *et al.*, 2017).

La capacidad de producción de biopelícula por *Acinetobacter* es uno de los principales factores de virulencia, para la persistencia en los diferentes ambientes, que además le confiere una cierta “resistencia” antibiótica. Este mecanismo tiene su acción al bloquear el paso de los antimicrobianos y se ha visto que puede actuar como sistema de comunicación para el control de expresión génica y fluctuaciones en la densidad poblacional (Ávila-Novoa *et al.*, 2019; Burmølle *et al.*, 2006; Du *et al.*, 2014; Espinal *et al.*, 2012).

La construcción de las biopelículas emplea muchos factores (adhesión, agregación, captación de hierro). Se ha reportado que el gen *bap* juega un papel muy importante en la acumulación de células y el establecimiento de la biopelícula y codifica para una proteína de superficie bacteriana que puede funcionar como adhesina para apoyar en la estructura de la biopelícula madura (Fattahian *et al.*, 2011; Loehfelm *et al.*, 2008). De manera similar la proteína A de membrana externa (*OmpA*) ayuda en la formación de una biopelícula más robusta (Gaddy *et al.*, 2009; Loehfelm *et al.*, 2008). El componente proteico principal son las proteínas curli, la subunidad principal es CsgA y se ha sugerido que tiene un papel importante en las etapas iniciales del desarrollo y fijación de la biopelícula (Barnhart & Chapman, 2006).

3.7. Producción de exopolisácaridos

Dentro de los factores de virulencia que se activan para que las bacterias como *A. baumannii* puedan tener una agregación y formar una biopelícula para la supervivencia a diferentes factores ambientales, se encuentran los exopolisácaridos (EPS; Yan, & Bassler, 2019). Los EPS primeramente ayudan a la adhesión entre las células bacterianas y a la superficie donde se establecerá la biopelícula, posteriormente llega a actuar como una barrera al ambiente directamente o a diferentes moléculas que causan estrés como los antibióticos (Joo, & Otto, 2012; Singh *et al.*, 2017). Cabe mencionar que los componentes de estos EPS se encuentran influenciados por las diferentes condiciones ambientales (Sugano *et al.*, 2016), algunos de los EPS (celulosa, el alginato, la poli-N-acetilglucosamina (PNAG) y el polisacárido Pel) se han relacionado a la patogenicidad y virulencia (Poulin, & Kuperman, 2021).

3.8. Movilidad

La movilidad bacteriana se asocia directamente con la virulencia (Mattick, 2002) y se ha visto que muchos aislados son móviles (Biswas *et al.*, 2019). La movilidad que muestra *Acinetobacter in vivo* es de tipo twitching y similar a swarming. La motilidad de tipo twitching se da por la extensión del pili retráctil tipo IV, dando un punto de anclaje y posteriormente la retracción del pili, provocando un movimiento de translocación, es comparable a un gancho de agarre. Los genes asociados a la formación del pili se encuentran en el operón *csu*, y codifica el sistema de ensamblaje de pili chaperone-usheer (Biswas *et al.*, 2019; Murray & Kazmierczak, 2008; Tomaras *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2019); por su parte, la motilidad de tipo swarming no se conoce del todo en *Acinetobacter*, ya que comúnmente este tipo de motilidad se caracteriza por el uso de flagelos de manera coordinada multicelular a través de una superficie semisólida (Biswas *et al.*, 2019; Murray & Kazmierczak, 2008). Se ha estudiado la motilidad “similar” swarming de *A. baumannii* y se ha visto que al compararse con lo que ocurre en *P. aeruginosa*, es un proceso bastante complejo que involucra la síntesis de 1,3-diaminopropano, detección de quórum, concentración de hierro, composición de lipopolisacárido y sensibilidad a la luz azul (Harding *et al.*, 2013; Skiebe *et al.*, 2012).

Los pili de tipo IV se ven involucrados en varios procesos, desde la adhesión hasta la motilidad (Fei.Ju *et al.*, 2018). En *P. aeruginosa* se reportó que la adhesión pili tipo IV desencadena una cascada de señalización aguas abajo, mejorando posteriormente la virulencia bacteriana (Persat *et al.*, 2015)

3.9. Capacidad de transformación

La transformación de manera natural de un microorganismo al adquirir ADN exógeno de manera horizontal es un proceso complejo. La transformación natural implica la absorción de ADN, su procesamiento y posteriormente la recombinación (Chen & Dubnau, 2004). Claramente, *A. baumannii* tiene una capacidad incomparable para cambiar, reorganizar y adquirir elementos genéticos, lo que lo hace altamente adaptable a su entorno y causa variación entre las cepas (Averhoff y Friedrich, 2003).

En específico, *A. baumannii* es naturalmente transformable a través de la absorción de ADN exógeno mediado por Pili tipo IV y la incorporación al genoma a través de la recombinación homóloga (Harding *et al.*, 2013; Metzgar *et al.*, 2004; Ramírez *et al.*, 2010). Esto explica la gran variabilidad de la cepa y el rápido desarrollo de la resistencia a los antibióticos.

3.10. Resistencia a antibióticos

Primero es importante definir que significa que una bacteria es resistente clínicamente. Esto se refiere a que puede ser inhibida por cualquier antibiótico en concentraciones muy altas, pero dichas concentraciones resultan tóxicas para el individuo. Además, una bacteria se puede clasificar como multirresistente al ser resistente a dos o más de los grupos de antibióticos. y panresistente al sobrevivir a cualquiera de los antibióticos actuales (Hernandez *et al.*, 2010; Joly-Guillou, 2005; Peleg *et al.*, 2008).

La resistencia antimicrobiana de las especies de *Acinetobacter* ha aumentado dramáticamente, algunas han pasado de ser multirresistente a panresistente (Eliopoulos *et al.*, 2008; Joly-Guillou, 2005; McConnell *et al.*, 2013; Tavakol *et al.*, 2018). En 1977 se reportó una tasa de mortalidad de 14% en casos de neumonía asociada a uso de ventiladores mecánicos causadas por *Acinetobacter* sensible al tratamiento con antibióticos, en comparación al 82% cuando era resistente al tratamiento (Glew *et al.*, 1977). De igual modo que en cepas de importancia clínica, se ha observado el aumento en los mecanismos de resistencia en cepas ambientales (localizadas en agua, agua residual, ambientes húmedos, suelo, lodo, plantas de tratamiento para el agua, etc.), las que actúan como reservorios ambientales para la transmisión de los genes que dan pauta para los mecanismos de resistencia (Al Atrouni *et al.*, 2016; Baumann, 1968; Zarrilli *et al.*, 2021).

Los principales mecanismos de resistencia de *Acinetobacter* spp. se pueden clasificar en tres categorías 1) inactivación por enzimas o enzimas inactivadoras, 2) acceso reducido a objetivos y 3) mutaciones que cambian objetivos y/o funciones celulares (Rice, 2006) (Ver Tabla 1). La inactivación por enzimas es el método más comúnmente observado en las bacterias Gram negativas, las enzimas se modifican de manera covalente

o hidrolizan los medicamentos volviéndolos incapaces de interactuar con su sitio objetivo (Abarca & Herrera, 2001; Egorov *et al.*, 2018).

Tabla 1. Mecanismos de resistencia a antibióticos por *A. baumannii*.

Clase de fármaco	Mecanismo de resistencia	Variantes	Referencias
β-lactámicos	Inactivación por enzimas	Clase A: TEM-1, TEM-2, TEM-92, TEM-116, SHV-5, SHV-12, CTX-M-2, CTX-M-43, VEB-1, PER-1, PER-2. Clase B (Métalo-lactamasas): IMP-1, IMP-2, IMP-4, IMP-5, VIM-1, VIM-2, SPM, NDM, SIM. Clase C (Cefalosporinas): AmpC Clase D (Oxacilinasas): OXA-23, OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-27, OXA-40, OXA-49, OXA-51, OXA-64, OXA-65, OXA-66, OXA-68, OXA-69, OXA-70, OXA-71, OXA-78, OXA-79, OXA-80, OXA-82, OXA-89.	(McConnell <i>et al.</i> , 2013; Rodríguez, <i>et al.</i> , 2016; Vanegas-Múnera <i>et al.</i> , 2014)
	Disminución de la expresión de proteínas de la membrana externa	CarO, Omp 33–36 kDa protein, OprD-like protein	(McConnell <i>et al.</i> , 2013)
	Expresión alterada de la proteína de unión a la penicilina	PBP2	(McConnell <i>et al.</i> , 2013)
	Bombas Efflux	AdeABC	(McConnell <i>et al.</i> , 2013)
Fluoroquinolonas	Modificación del objetivo	Mutaciones en <i>gyrA</i> y <i>parC</i>	(McConnell <i>et al.</i> , 2013)
	Bombas Efflux	AdeABC, AdeM	(McConnell <i>et al.</i> , 2013)
Aminoglucósidos	Enzimas modificadoras de aminoglucósidos	AAC, ANT, APH	(McConnell <i>et al.</i> , 2013; Vanegas-Múnera <i>et al.</i> , 2014)

	Bombas Efflux	AdeABC, AdeM	(McConnell <i>et al.</i> , 2013; Vanegas-Múnera <i>et al.</i> , 2014)
	Metilación 16S ARN	ArmA	(McConnell <i>et al.</i> , 2013; Vanegas-Múnera <i>et al.</i> , 2014)
Quinolonas	Mutación génica	<i>gyrA</i> , <i>parC</i>	(McConnell <i>et al.</i> , 2013; Vanegas-Múnera <i>et al.</i> , 2014)
	Bombas Efflux	AdeABC, AdeM	(McConnell <i>et al.</i> , 2013; Vanegas-Múnera <i>et al.</i> , 2014)
Tetraciclinas y Gliciliclinas	Bombas Efflux	TetA, TetB, AdeABC	(McConnell <i>et al.</i> , 2013; Vanegas-Múnera <i>et al.</i> , 2014)
	Protección ribosomas	TetM, TetO	(McConnell <i>et al.</i> , 2013; Vanegas-Múnera <i>et al.</i> , 2014)
Polimixinas (colistina)	Modificación de lípido A	<i>pmrA</i> , <i>pmrB</i>	(McConnell <i>et al.</i> , 2013; Vanegas-Múnera <i>et al.</i> , 2014)
	Pérdida del LPS	LpxABC	(Vanegas-Múnera <i>et al.</i> , 2014)
	Modificación de porinas	OmpW	(McConnell <i>et al.</i> , 2013; Vanegas-Múnera <i>et al.</i> , 2014)
Trimetoprim, sulfonamidas y cloranfenicol	Modificación del blanco	<i>sul</i> , <i>dnfr</i>	(Vanegas-Múnera <i>et al.</i> , 2014)
	Bombas Efflux	CraA, AdeABC	(Vanegas-Múnera <i>et al.</i> , 2014)

Las enzimas β -lactamasas son el mecanismo principal para la resistencia a los antibióticos β -lactámicos. Su mecanismo de acción consiste en hidrolizar el anillo β -lactámico del antibiótico, actividad común para los antimicrobianos de este grupo entre los que se conocen: penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos. Se han llegado a reportar hasta 2,800 β -lactamasas únicas (Abarca & Herrera, 2001; Bush, 2018). La clasificación clásica de estas enzimas se lleva a cabo sobre la similitud en la secuencia de sus aminoácidos, clasificándolas en las clases A, B, C y D (Bush, 2018; Pandey *et al.*,

2021). Las enzimas de clase A, C y D son serina de sitio activo β -lactamasas, mientras que las enzimas de Clase B son metalo- β -lactamasas (Pandey *et al.*, 2021).

En los últimos años las β -lactamasas de clase A y D han presentado una mayor capacidad para hidrolizar; dado el enfoque de nuestra investigación, nos centraremos en las β -lactamasas de la clase D conocidas como oxacilinasas u OXA. Estas son intrínsecas de muchas bacterias Gram negativas como *Acinetobacter* spp., sin embargo, en los últimos años han tenido una gran expansión entre las bacterias, por lo que se han encontrado tanto en cromosomas bacterianos como plásmidos. Esto es de gran preocupación ya que las oximino-cefalosporinas se utilizan como último recurso para el tratamiento de infecciones (Pandey *et al.*, 2021).

3.11. Interacción de proteínas *in silico*: resistencia a antimicrobianos y factores de virulencia

Las exposiciones de bacterias a concentraciones subinhibitorias de cualquier antimicrobiano puede provocar cambios fisiológicos exacerbados (Ranieri *et al.*, 2018). En la literatura no se encontraron referencias directas con la oxacilinasas-89 que es uno de los objetos de estudio, sin embargo, Fernández *et al.* (2012) mostraron que la sobreexpresión de OXA-10-like y OXA-24 alteraron la formación de biopelículas mientras que no hubo cambio en la morfología y la tasa de crecimiento en *E. coli*; en *A. baumannii* Colquhoun *et al.* (2021), reportaron que con la sobreexpresión de OXA-23 se observaron alteraciones en la estructura de peptidoglucanos.

En la base de datos STRING se ha reportado interacción entre proteínas para la recombinación homóloga (*recA*), para la modulación de la topología del ADN (*gyrB*), para condensación de moléculas en rutas energéticas (*gltA*) y otros tipos de β -lactamasas (IX87_12750, IX87_16465, AIL79169.1) con la proteína bla-OXA-69 (Figura 3), dando pauta a las posibles interacciones en las rutas metabólicas de la expresión de los factores de virulencia en el modelo que proponemos.

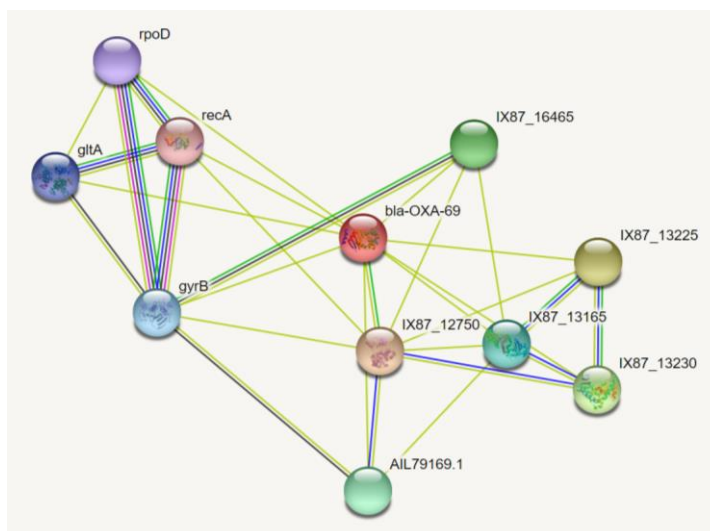


Figura 3. Asociaciones de proteínas en relación a *bla*_{OXA-69} en *A. baumannii* (Fuente de la imagen: string-db.org).

3.12. Antibióticos utilizados para evaluar virulencia bacteriana

Existen diversos reportes donde la formación de biopelícula y otros factores de virulencia (movilidad, adhesión, expresión de toxinas, etc.) se ve alterada a concentraciones subinhibitorias de antibióticos como: *S. epidermidis* con cefamandole, novobicina, vancomicina, azitromicina, quinupristina-dalfopristina y tetraciclinas (Kaplan *et al.*, 2011); *Staphylococcus aureus* con oxacilina, cefalexina, cefalotina, vancomicina, y linezolid (Frank *et al.*, 2007; Mirani, & Jamil, 2011; Subrt *et al.*, 2011); *P. aeruginosa* con gentamicina, tobramicina, imipenem, ciprofloxacina, claritromicina y tetraciclinas (Alhajlan *et al.*, 2013; Elliott *et al.*, 2010; Hoffman *et al.*, 2007; Linares *et al.*, 2006); *E. coli* con varios tipos de aminoglucósidos, de β -lactámicos, de fluoroquinolonas y cloranfenicol, macrólidos, rifampicina y tetraciclinas (Boehm *et al.*, 2009; Hoffman *et al.*, 2007; García-Heredia *et al.*, 2016) y *Listeria monocytogenes* con triclosán (Christensen *et al.*, 2011).

Existen pocos reportes sobre cambios en los factores de virulencia de *Acinetobacter*; sin embargo, en *A. baumannii*, Prieto Martin Gil *et al.*, (2021) reportaron que a concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos (etanol, clorhexidina y rifampicina) afectaron la expresión de tres bombas de flujo y su sistema regulador. Así mismo, Nucleo *et al.* (2009), reportaron la inducción de formación de biopelícula en

aislados de *A. baumannii* al ser expuestos a concentraciones subinhibitorias de imipenem. Por ser un nicho desconocido, es importante estudiar como impactarán concentraciones subletales de antibiótico en una cepa resistente directamente al mismo antibiótico.

4. JUSTIFICACIÓN

A. baumannii es un patógeno multirresistente asociado a infecciones con alta mortalidad, representando un serio problema de salud pública. Los aislados de las diferentes especies de *Acinetobacter*, en específico *A. baumannii* se han localizado en agua, suelo, área pecuaria, agricultura, industria alimentaria y tratamientos de aguas residuales, sin embargo, la ubicuidad de la bacteria hace que sea difícil ubicar los reservorios naturales puntualmente.

Sumado a ello, las terapias inadecuadas, así como el uso de antimicrobianos como promotores del crecimiento o profilácticos en el área pecuaria y las limitadas referencias sobre residuos de antibióticos en alimentos, nos hace reflexionar sobre: *¿Cuál será el impacto de bajas dosis o residuos de antibióticos en bacterias resistentes a los mismos?* En especial, cuando se tienen antecedentes en nuestro laboratorio que demuestran alteraciones fenotípicas en otra especie bacteriana bajo similar condición.

La presión selectiva que ocurre de modo natural en cepas como *Acinetobacter*, que adquieren usualmente genes de resistencia o virulencia, por su elevada frecuencia de transformación, necesitan ser investigada a profundidad. Además, estudios como el que proponemos realizar nos lleva a reflexionar sobre la liberación de moléculas antibióticas al medio ambiente, lo cual puede empeorar la situación ya existente.

5. HIPÓTESIS

A. baumannii resistente a OXA expuesta a este mismo antibiótico, mostrará cambios fenotípicos y genotípicos debido a interacciones en las rutas metabólicas relacionadas con la virulencia.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo General.

Caracterizar cambios fenotípicos y genotípicos en *A. baumannii* resistente a OXA expuesto a concentraciones de este antibiótico que inducen β -lactamasas OXA.

6.2. Objetivos específicos.

1. Determinar la concentración mínima bactericida de *A. baumannii* en presencia de oxacilina, seguido de ensayo de viabilidad para definir concentraciones subinhibitorias inductoras de β -lactamasas OXA no tóxicas.
2. Determinar cambios en la movilidad tipo Twitching y tipo Swarming en *A. baumannii* en presencia de oxacilina.
3. Cuantificar la producción de biopelícula y exopolisácaridos formada por *A. baumannii* en presencia de oxacilina.
4. Evaluar la capacidad de transformación de *A. baumannii* en presencia de ADN exógeno (plásmidos o secuencias amplificadas de ADN de resistencia a espectinomicina) después de la exposición a oxacilina.
5. Analizar el impacto de las betalactamasas OXA en el comportamiento genotípico de *A. baumannii*.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos. Se utilizaron las cepas de *A. baumannii* ATCC BAA-2093 OXA-89, que fue adquirida comercialmente de American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EUA) y proviene de un cultivo de sangre en Buenos Aires, Argentina y *A. baumannii* ATCC 19606 OXA-133, que fue adquirida comercialmente de ATCC y proviene de un cultivo de orina.

Además, se utilizó la cepa de *E. coli* DH5 α que tiene el plásmido pTargetF resistente a espectinomicina, fue adquirida de Addgene (Watertown, Massachusetts, EUA) para la obtención de plásmidos y secuencias de resistencia al antibiótico mencionado.

Las cepas se han conservado en caldo Infusión Cerebro Corazón (ICC) a -80°C con una solución al 20% de glicerol (Sigma-Aldrich). El cultivo de *A. baumannii* se reactivó en caldo Soya Trypticaseína (del inglés, TSB, marca) y se incubó a 37°C/24 h. Después se sembró en agar TSB, a 37°C/24 h y se aisló una colonia para sembrar en tubos conteniendo 16 ml de agar TSB, este se incubó a 37°C/24 h para ser conservado a 4°C por no más de 4 semanas. Para los ensayos se tomó una asada del tubo en refrigeración y se colocó en un tubo con 5 ml de caldo TSB para incubar durante la noche a 37°C. En contraste, las cepas de *E. coli* se activaron directo en placas de agar Luria Bertani (LB) con 50 μ g/ml de espectinomicina, para los plásmidos *pTargetF* respectivamente. Una colonia aislada se inoculó en caldo LB, conteniendo el antibiótico correspondiente y se incubaron a 37°C/24 h para proceder a la extracción alcalina de los plásmidos.

7.1. Antimicrobiano

Se utilizó como antimicrobiano la sal de oxacilina (sodium salt; Bio basic, Markham, Ontario, Canadá). Se realizó una solución madre de 50 mg/ml (disolviéndose en agua destilada), de la cual se partió para realizar las diferentes diluciones a utilizar en los ensayos. Se almacenará a 4°C en frascos estériles y protegidos de la luz.

7.2. Concentración mínima bactericida (CMB)

La determinación de la concentración mínima bactericida se realizó en base al procedimiento de microdilución en placa reportado por García-Heredia *et al.* (2016). Se utilizaron placas de 96 pocillos, en cada uno se añadieron 100 μ l de caldo TBS 2X, 20 μ l de cultivo *A. baumannii* ajustado a A_{600nm} : 0.5 (2×10^8 UFC/ml) y 80 μ l de oxacilina con las diferentes concentraciones a estudiar [v/v] y se incubó a 37°C/24 h. Como control positivo se tomó un pocillo con caldo TBS 2X y cultivo de *A. baumannii* y como control negativo solamente se colocó el caldo TBS. La CMB fue la concentración mínima en la cual no se observó crecimiento.

7.3. Determinación de la viabilidad

Se realizó una curva de crecimiento de *A. baumannii* a concentraciones sub-CMB para conocer el efecto de la oxacilina en su cinética. El cultivo crecido durante la noche (ver punto 7.2) se ajustó a una A_{600nm} de 0.5 (2×10^8 UFC/ml) y se inocularon 2 ml en matraces conteniendo 18 ml caldo TBS, más las concentraciones subinhibitorias a evaluar (0.25, 0.5 y 1.0 mg/ml) con un volumen total 20 ml. Durante la incubación a 37°C /24 h/150 rpm se tomaron muestras cada 2 h entre las horas 0 y 10 y a la hora 24. Las muestras de 200 μ l de cultivo se tomaron para realizar diluciones decimales (de 10^{-1} hasta 10^{-8}) con solución de NaCl al 0.85%. Una alícuota de 100 μ l se sembró en agar TBS para su posterior cuantificación. Como control negativo se tomó medio sin inocular, con la concentración sub-CMB y como control positivo se tomó medio inoculado sin antibiótico, ambos estuvieron en las mismas condiciones que el cultivo a probar (Ortiz *et al.*, 2021).

7.4. Ensayos de motilidad

7.4.1. Ensayo de movilidad de tipo Twitching

En cajas Petri con 25 ml de medio LBNS (medio LB sin sales) con una punta de micropipeta de 1000 μ l se realizó un pequeño pozo en el centro del agar y se colocaron 10 μ l de células previamente ajustadas a una A_{600nm} de 0.5 (2×10^8 UFC/ml) y pre-expuestas por 1h y 2h a concentraciones subinhibitorias de oxacilina. Se incubaron a 37°C/ 24 h. La motilidad se observó quitando el medio y tiñendo con 4 ml de cristal violeta al 0.1% y

lavando con PBS a 1 M y se registró la motilidad, además de tomar evidencias fotográficas (Biswas *et al.*, 2019).

7.4.2. Ensayo de motilidad tipo Swarming

Para preparar el medio, se utilizó por cada litro de medio NB (caldo nutritivo) 3.5 g de agar bacteriológico (0.35%), y 500 µl de Rezarzurina al 10%. Con una punta de micropipeta de 10 µl se realizó un pequeño pozo en el centro del agar y se colocaron 10 µl de células suspendidas (como se realizó en el paso anterior). Se incubaron a 37°C y se monitoreo durante 23 h sin demasiada exposición a la luz. Se registró la motilidad, además de tomar evidencias fotográficas (Biswas *et al.*, 2019).

7.5. Cuantificación de exopolisácaridos

La cuantificación de la producción total de exopolisácaridos se realizó mediante el cultivo de las cepas de *A. baumannii* en medio TBS con concentraciones subinhibitorias de oxacilina (0.25, 0.5 y 1 mg/ml) por un periodo de 4 y 6 h. Posteriormente se tomó 1 ml del cultivo y se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min y se decantó. El pellet obtenido se resuspendió con 1 ml de solución salina estéril al 0.85% para posteriormente adicionar un volumen igual de fenol al 5%, y cinco volúmenes de H₂SO₄. Por último se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad por 1 h y se midió A_{490 nm}. Como control se colocó la solución salina, el fenol y el ácido (Abirami *et al.*, 2021).

7.6. Determinación del índice de formación de biopelícula (del inglés BFI)

Se realizó en placas de 96 pozos con 100 µl de caldo TBS 2X, 80 µl de la solución de oxacilina a las diferentes concentraciones en estudio seleccionadas y 20 µl del inóculo (previamente expuesto a Oxacilina por 4 y 6 h), para un total de 200 µl. Después de incubar a 37°C/24 h, se realizaron lecturas a A_{630 nm}. Posteriormente, se retiró el medio líquido de todos los pozos y se hizo un lavado con agua destilada estéril, se dejó secar a temperatura ambiente. Se tiñeron con 250 µl de cristal violeta al 0.1% durante 15 min y se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril y se secó de nuevo a temperatura ambiente. Por último, se colocaron 250 µl de etanol al 96% por 5 min/37°C para solubilizar el colorante y

realizar una lectura a 570 nm. Como controles se colocó medio con la solución del antibiótico sin inocular y medio de cultivo con bacterias sin tratamiento.

La formación de biopelícula se cuantificó con la siguiente formula:

$$IFB = (AB - CW) / G$$

IFB: Índice de formación de biopelícula.

AB: A_{570nm} de la matriz y células teñidas.

CW: A_{570nm} del medio sin inóculo (control teñido).

G: A_{630nm} de las células que se encontraba en suspensión.

Tabla 2. Interpretación de formación de biopelícula (García-Heredia et al., 2013).

Clasificación	BFI
No formación de biopelícula	<0.35
Biopelícula débil	0.35-0.69
Biopelícula moderada	0.70-1.09
Biopelícula fuerte	>1.10

7.7. Evaluación de la capacidad de transformación

7.7.1. Extracción de plásmidos *pTargetF*

La extracción alcalina de los plásmidos partió de una colonia de *E. coli* DH5 α crecida en agar LB e inoculada en 15 ml de caldo LB. Los medios debieron contener espectinomicina (esp) para *pTargetF* (50 μ g/ml) y se incubaron en agitación (250 rpm) a 37°C/24 h. La extracción de los plásmidos se realizó de acuerdo con el protocolo de Dalaney *et al.*, (2018) modificado. En tubos Eppendorf se colocaron 2 ml del cultivo y se centrifugaron a 8,000 rpm/5 min y se decantó. El pellet se resuspendió en 200 μ l de Solución I por 5 min, después se le añadieron 400 μ l de la Solución II y se incubó a 4°C/5 min. Posteriormente, se neutralizó con 300 μ l de acetato de potasio 7.5 M (pH 7.8) a 4°C/10 min, terminando el tiempo se centrifugó a 14, 000 rpm/10 min. Se recuperó la fase acuosa (contiene el plásmido) y se colocó un volumen igual de isopropanol frío por 30

min a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm/10 min/4°C. El sobrenadante se decantó y se añadieron 500 µl de etanol al 70% y se volvió a centrifugar a 14,000 rpm/10 min/4°C. El sobrenadante se decantó y se resuspendió en 30 µl de agua. Se visualizaron los plásmidos con electroforesis en gel de agarosa 0.8%, teñido con GelRed® (80V/1 h) y un marcador de 1 kb (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). El Gel se reveló en el fotodocumentador.

- Solución I: Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM y EDTA 10 mM, pH 8.
- Solución II: NaOH 0.2 N, SDS 1% [p/v].

7.7.2. Amplificación de las secuencias esp de los plásmidos

Con el templado de los plásmidos se realizó una PCR punto final con los cebadores que se encuentran en la Tabla 3.

Tabla 3. Cebadores para la amplificación de secuencias de plásmidos de resistencia a antibióticos.

Plásmido	Cebador (5'-3')	Tamaño del amplicón (pb)	Referencia
Flanqueantes			
<i>pTargetF</i>	F: TCCACCATGATATTCGGCAA R: GAAGTGGTGGCCTAACTACG	1,467	J. Eduardo Palomino Reyna (Tesis de licenciatura)
Interior de la secuencia			
<i>pTargetF</i>	F: CAATTTGGAGAATGGCAGCG R: CAAATGCGGGACAACGTAAG	298	J. Eduardo Palomino Reyna (Tesis de licenciatura)

Las condiciones de la PCR se realizaron según el protocolo GoTaq Flexi (PROMEGA). Se amplificó el ADN en 50 µl de una mezcla que contenía 10 µl de buffer de reacción, 6 µl de MgCl₂, 1 µl de cada primer, 1 µl de dNTP's, 0.25 µl de Taq ADN polimerasa, 1 µl de la muestra de ADN y agua (ddH₂O c.s.) Las condiciones de amplificación utilizadas fueron las siguientes: 1 ciclo de 2 min/95°C para desnaturalización inicial, seguido de 35 ciclos de amplificación: 30 s a 94°C, 90 s a

57°C(esp) y 30s a 72°C, y una extensión final de 5 min a 72°C. La electroforesis y obtención de imágenes fueron como en el paso anterior.

7.7.3. Ensayo de transformación

Se realizó según el método de Traglia *et al.* (2016) modificado. Una alícuota (100 µl) de cepa de *A. baumannii* fue activada y ajustada por absorbancia (ver punto 7.2) en matraces con 10 ml de caldo LB, conteniendo las concentraciones sub-inhibitorias de oxacilina seleccionadas. Se tomaron 2 ml de cultivo durante el periodo de incubación de 6 y 24 h para relacionar la fase de crecimiento (estacionaria y exponencial) con la capacidad de transformación. El cultivo (2 ml), se lavó con PBS y se ajustó con caldo LB nuevamente y se pasaron 100 µl a un tubo Eppendorf conteniendo de 600±100 ng de ADN exógeno (plásmido: evaluar capacidad de transformación, secuencia: para evaluar la recombinación homóloga) y se incubó a 37°C/1 h. En placas de agar TSB con esp (50 µg/ml), se inocularon 50 µl de cultivo y sus correspondientes diluciones 1:10 hasta 10⁻⁵ y se incubaron a 37°C/24 h. Como control se realizó el ensayo con cepas sin la adición de antibióticos, pero si ADN. Se calculó la frecuencia de transformación utilizando la calculadora [on line Gateway](https://www.sciencegateway.org/tools/transform.htm) disponible en: <https://www.sciencegateway.org/tools/transform.htm> y los datos obtenidos fueron expresado en UFC/ng de ADN. Se confirmaron la transformación con PCR punto final (oligonucleótidos en la tabla 3).

7.8. Análisis de expresión génica

El análisis de expresión de genes se realizó por PCR Tiempo Real. Para este ensayo se realizó la extracción de ARN (posterior a los tratamientos aplicados a *A. baumannii*) siguiendo el protocolo del fabricante del método TRIzol (Bioline London, England). Después se realizó la síntesis de ADNc, el cual fue utilizado como templado para la cuantificación de la expresión de genes mediante RT-PCR (PikoReal 96, Thermo Scientific, Massachusetts, EUA) con Q SYBR Green Supermix y oligonucleótidos que permitieron un producto amplificado ≤ 200 pb. Los resultados se normalizaron por cuantificación relativa, utilizando un gen constitutivo (*16S-ARNr*) perteneciente a la especie en estudio. Posteriormente se analizó la expresión de genes como número de

veces, relacionando la diferencia entre el valor del ciclo umbral de los genes blanco y el gen de referencia, este último utilizado como normalizador, representando el valor 1.

El cálculo de la expresión de los genes se llevó a cabo mediante el método delta Ct, siendo las bacterias sin tratamiento las que se utilizaron como controles y línea base en la comparación de la expresión génica siguiendo la formula:

$$\text{Expresión relativa} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_{\text{Ptarget}}(\text{promedio del control}-\text{Promedio de la muestra})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta C_{\text{Pref}}(\text{promedio del control}-\text{Promedio de la muestra})}}$$

Siendo E_{target} la eficiencia de la PCR en tiempo real del amplicón en estudio; E_{ref} , la eficiencia de la PCR en tiempo real del gen de referencia; $\Delta C_{\text{Ptarget}}$ es la desviación en Ct del promedio del control menos el promedio de la muestra del gen en estudio; y ΔC_{Pref} es la desviación en Ct del promedio del control menos el promedio de la muestra del gen de referencia.

En el presente proyecto se propuso estudiar como blanco los genes presentes en *A. baumannii* (Tabla 4): *bla-OXA* (enzima oxacilinas, protección contra antibióticos β -latamicos), *pilA* (subunidad del pili tipo IV), *tonB* (absorción activa de hierro), *ddc* y *dat* (enzimas para motilidad tipo swarming) y *csuE* (fimbria chaperona-usher, para unión a superficie).

Tabla 4. Cebadores para el análisis de expresión génica relacionada a los ensayos.

Gen	Cebador (5'-3')	Tamaño del amplicón (pb)	Ensayo
<i>bla-OXA</i>	F: CTCCTCAGCAAGAGGCACAA R: GAGGCTGAACAACCCATCCA	195	Todos los ensayos (gen constitutivo y de comparación)
16s	F: TTAAAGCGAGGAGGAGG R: ATTCTACCATCCTCTCCC	242	
<i>pilA</i>	F: GGGGTTGCTGTTGCACTTTT R: TGCCGTTGCATCACGACTAT	183	Twitching
<i>tonB</i>	F: TCCTCTGCAATCGCCTCATC R: ATGCCAGGAACAGTACGCAA	251	
<i>ddc</i>	F: AAAGCCCGGCAGGTTCATTA R: AACACCAGCCTGACCAGAAC	86	Swarming
<i>dat</i>	F: GAAAGCACAAAGGTTGCTGGG R: GCACCAGAAGGACCACAGAA	258	
<i>csuE</i>	F: GGGTTTGTGTCATGTACGGGTT R: TTCTCCGGTCTGAGCATTGG	106	Biopelícula

7.9. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa IBM SPSS Statistics, Windows, Versión 20.0 (IBM Corp, Armonk, NY, EUA) y Origin (Windows, Versión 9.0, Texas, EUA) para el diseño de gráficos, dónde se observó la variación de medias y prueba de Duncan para la comparación con los controles con una confiabilidad del 95%. Cada ensayo se realizó por triplicado.

8. RESULTADOS

8.1. Concentración mínima bactericida

La CMB del antibiótico oxacilina se determinó mediante el método de microdilución en placa encontrando concentraciones de hasta 15 mg/ml (Tabla 5; García-Heredia *et al.*, 2016; Ortiz *et al.*, 2021). Encontrando que la cepa ATCC 19606 tuvo 1.5 veces más resistencia a la oxacilina que la cepa ATCC BAA-2093.

Tabla 5. CMB de cepas de *A. baumannii* en presencia de oxacilina.

Cepa	Concentración (mg/ml)
ATCC BAA-2093	5 ±0.0
ATCC-19606	15 ±0.0

±: Desviación Estándar.

8.2. Efecto de la concentración sub-inhibitoria de la oxacilina sobre el crecimiento de las cepas de *A. baumannii*

Una vez obtenidas las CMB se determinó el efecto las concentraciones subinhibitorias (sub-CMB) de oxacilina en el crecimiento de las cepas de *A. baumannii* en estudio mediante el método de cuenta en placa en agar TBS. Las sub-CMB de oxacilina mostraron efecto bacteriostático cuando se expuso la bacteria a concentraciones de 0.25, 0.5 y 1.0 mg/ml en ambas cepas, en especial en la cepa 19606 en la cual la viabilidad se afectó hasta 2.5 logaritmos ($p \leq 0.05$; Tabla 6).

Tabla 6 . Viabilidad de *A. baumannii* en presencia de oxacilina.

Sub-CMB de OXA (mg/ml)	Viabilidad de <i>A. baumannii</i> (UFC/ml) respecto al tiempo						
	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	24 h
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606							
0 (Control)	7.3±0.2a	7.7 ±0.1a	9.0 ±0.0a	9.4 ±0.1a	9.3 ±0.2a	9.4 ±0.1a	9.5 ±0.2a
0.25	7.3 ±0.1a	6.8 ±0.2b*	6.8 ±0.3b*	6.6 ±0.2b*	6.7 ±0.3b*	6.4 ±0.0b*	9.1 ±0.1b*
0.5	7.4 ±0.1a	6.7 ±0.4b*	6.4 ±0.3c*	5.9 ±0.1d*	5.8 ±0.3d*	6.4 ±0.1b*	8.4 ±0.2c*
1.0	7.3 ±0.2a	6.5 ±0.2c*	6.4 ±0.2c*	6.2 ±0.4c*	6.0 ±0.0c*	5.7 ±0.1c*	6.2 ±0.02d*
<i>A. baumannii</i> ATCC BAA 2093							
0 (Control)	7.5 ±0.1a	8.27±0.1a	9.4 ±0.1a	9.4 ±0.1a	9.4 ±0.1a	9.4 ±0.1a	9.5 ±0.1a
0.25	7.6 ±0.1a	7.29±0.5b*	7.1 ±0.9b*	7.7 ±0.2b*	8.3 ±0.1b*	7.0 ±0.9b*	7.4 ±0.5b*
0.5	7.6 ±0.1ab	7.12±0.1bc*	7.1 ±0.5b*	7.4 ±0.1c*	7.4 ±0.3c*	6.7±0.5bc*	7.3 ±0.2b*
1.0	7.6 ±0.1ab	7.0 ±0.2c*	6.9 ±0.4b*	6.7 ±0.2d*	6.8 ±0.3d*	6.5 ±0.1c*	5.2 ±0.3c*

±: Desviación Estándar. Las letras indican diferencias con el grupo control.

(*) Significancia estadística ($P \leq 0.05$).

8.3. Efecto de la concentración sub-inhibitoria de la oxacilina sobre la motilidad tipo twitching y swarming de las cepas de *A. baumannii*

Las motilidades de ambas cepas fueron probadas para comprobar primeramente su desplazamiento. La cepa ATCC 19606, como ya se encuentra reportado, no tiene movilidad (Biswas *et al.*, 2019), por ello fue utilizada como control negativo en los ensayos (resultados no mostrados).

La motilidad twitching y swarming de la cepa ATCC BAA 2093 fue dosis dependiente, observándose reducción en la motilidad a medida que aumentaron las sub-CMB de oxacilina a la cual fue pre-expuesta, exceptuando dos casos; 1) el caso de motilidad swarming (tabla 7) 1 h a 0.5 mg/ml (3.8 ± 0.3 , $p \leq 0.05$), siendo más baja que la de 1 mg/ml (4.3 ± 0.4 , $p \leq 0.05$); 2) en la motilidad tipo twitching en 1 h de pre exposición a 0.25 mg/ml (3.1 ± 0.1 , $p \leq 0.05$) y en la motilidad tipo swarming con una pre exposición de 2 h a la misma concentración de oxacilina se observó aumento en comparación con el control (0.4 y 0.8 cm respectivamente, tabla 7).

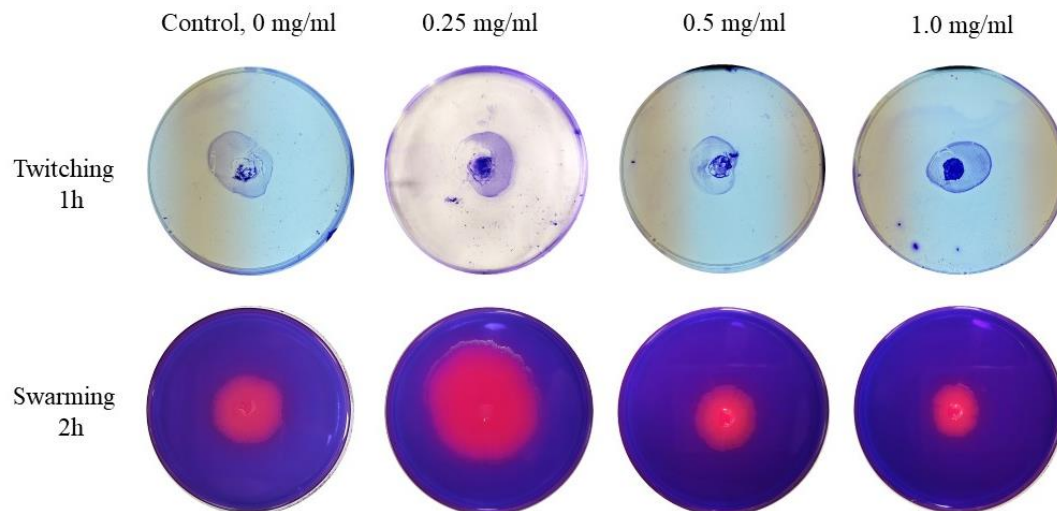


Figura 4. Efecto de la pre-exposición a concentraciones sub-inhibitorias de oxacilina sobre la motilidad tipo twitching por 1 h y swarming por 2 h de la cepa *A. baumannii* ATCC BAA2093, donde se muestran la mayor diferencias.

Tabla 7. Motilidad tipo twitching y swarming de la cepa ATCC BAA 2093 con respecto al tiempo..

Concentración (mg/ml)	Movilidad (cm) respecto al tiempo			
	Twitchig		Swarming	
	1 h	2 h	1 h	2 h
0 (Control)	2.7 ±0.1b*	3.4 ±0.2c*	5.6 ±0.1a	3.5 ±0.4bc*
0.25	3.1 ±0.1c*	3.0 ±0.2bc*	4.9 ±0.1b*	4.3 ±0.3c
0.5	2.8 ±0.1b*	2.5 ±0.4ab*	3.8 ±0.3c*	4 ±0.2bc
1.0	2.2 ±0.0a	2.2 ±0.2a	4.3 ±0.4c*	2.9 ±0.3a*

±: Desviación Estándar. Las letras indican diferencias con el grupo control.

(*) Significancia estadística ($p \leq 0.05$).

8.4. Efecto de la concentración sub-inhibitoria de la oxacilina sobre la producción total de exopolisácaridos de las cepas de *A. baumannii*

La cuantificación de la producción total de exopolisácaridos (EPS) nos muestra que en ambas cepas de *A. baumannii* aumenta la producción en relación al tiempo del ensayo en los grupos controles. El aumento de la concentración de la oxacilina provocó

reducción en la producción de EPS, viéndose más afectada la cepa ATCC 19606. En la figura 9 y en la tabla 8, podemos observar un ligero aumento en la producción de EPS en la concentración 0.25 mg/ml de oxacilina en 2 h de ensayo en la bacteria ATCC BAA 2093, sin embargo, no se considera significativa estadísticamente.

Tabla 8. Cuantificación de producción total de exopolisacáridos de la cepa de *A. baumannii* ATCC 19606. Y ATCC BAA 2093.

	<i>A. baumannii</i> ATCC 19606		<i>A. baumannii</i> ATCC BAA 2093	
	Tiempo (h)			
Concentración (mg/ml)	2 h	6 h	2 h	6 h
0 (Control)	1.2 ±0.1a	2.34 ±0.3a	1.5 ±0.9a	2.6 ±0.3a
0.25	0.9 ±0.1b*	1.2 ±0.1b*	1.6 ±0.9a	1 ±0.1b*
0.5	0.9 ±0.2b*	0.9 ±0.1b*	0.7 ±0.1b*	0.8 ±0.2bc*
1.0	0.9 ±0.1b*	1 ±0.1d*	0.9 ±0.1b*	0.9 ±0.1c*

±: Desviación Estándar. Las letras indican diferencias con el grupo control.

(*) Significancia estadística ($P \leq 0.05$).

8.5. Efecto de la concentración sub-inhibitoria de la oxacilina sobre el índice de formación de biopelícula de las cepas de *A. baumannii*

El ensayo de índice de formación de biopelícula (IFB) se realizó en placas de 96 pozos con caldo TBS al 2X, la bacteria ajustada $A_{600nm}:0.5$ (10^8 UFC/ml) y la concentración de oxacilina respectiva para cada ensayo. La bacteria ajustada que se utilizó para el ensayo de IFB se expuso previamente a la concentración correspondiente del antibiótico por 2 y 6 h respectivamente. Posteriormente se realizó un lavado de la bacteria mediante centrifugación y decantación del medio que contenía el antibiótico, para poder resuspenderla en caldo TBS nuevo y ser ajustada. La bacteria finalmente se llevó al ensayo de formación de biopelícula donde este se realizó bajo condiciones constantes de antibiótico, es decir la misma concentración a la cual previamente se había expuesto el cultivo y sin concentración de antibiótico.

Tabla 9. Índice de formación de biopelícula de la cepa de *A. baumannii* ATCC 19606 Y ATCC BAA 2093.

Índice de formación de biopelícula con respecto al tiempo				
	<i>A. baumannii</i> ATCC 19606		<i>A. baumannii</i> ATCC BAA 2093	
Concentración de oxacilina en mg/ml (pre-exposición/ensayo formación de biopelícula)	2 h	6 h	2 h	6 h
0.00/ 0.00	2 ±0.2a	2 ±0.0b	0.6 ±0.3b	0.6 ±0.2a
0.25/ 0.00	1.6 ±0.1bc*	3.3 ±1.1c*	0.9 ±0.6b	0.8 ±0.3ab
0.50/ 0.00	1.6 ±0.5c*	1 ±0.9a*	1 ±0.9c*	0.6 ±0.3a
1.00/ 0.00	1.5 ±0.5c*	5.1 ±0.1.6c*	0.8 ±0.2b	1 ±0.7b*
0.25/ 0.25	1.9 ±0.1ab	2 ±0.0b	0.4 ±0.4a*	1 ±0.4b*
0.50/ 0.50	1.9 ±0.2ab	1 ±0.3a*	0.5 ±0.2a*	1 ±0.2b*
1.00/ 1.00	2 ±0.1a	2 ±0.3b	0.6 ±0.4b	0.8 ±0.4ab

±: Desviación Estándar. Las letras indican diferencias con el grupo control.

(*) Significancia estadística ($P \leq 0.05$).

La cepa 19606 pre-expuesta a 0.25 mg/ml por 6 h aumentó la producción de biopelículas 0.65 veces ($P < 0.5$) cuando se llevó el ensayo sin antibiótico, y al mantener las concentraciones de oxacilina durante la formación de biopelículas no mostró cambios en el comportamiento (Tabla 9). Mientras que el cultivo de la cepa ATCC BAA 2093 pre-expuesto a 0.25 y 0.5 mg/ml que desarrolló la biopelícula en igual (6 h) o sin (2 h) antibiótico mostró hasta 0.7 veces ($P < 0.5$) más producción con respecto al control.

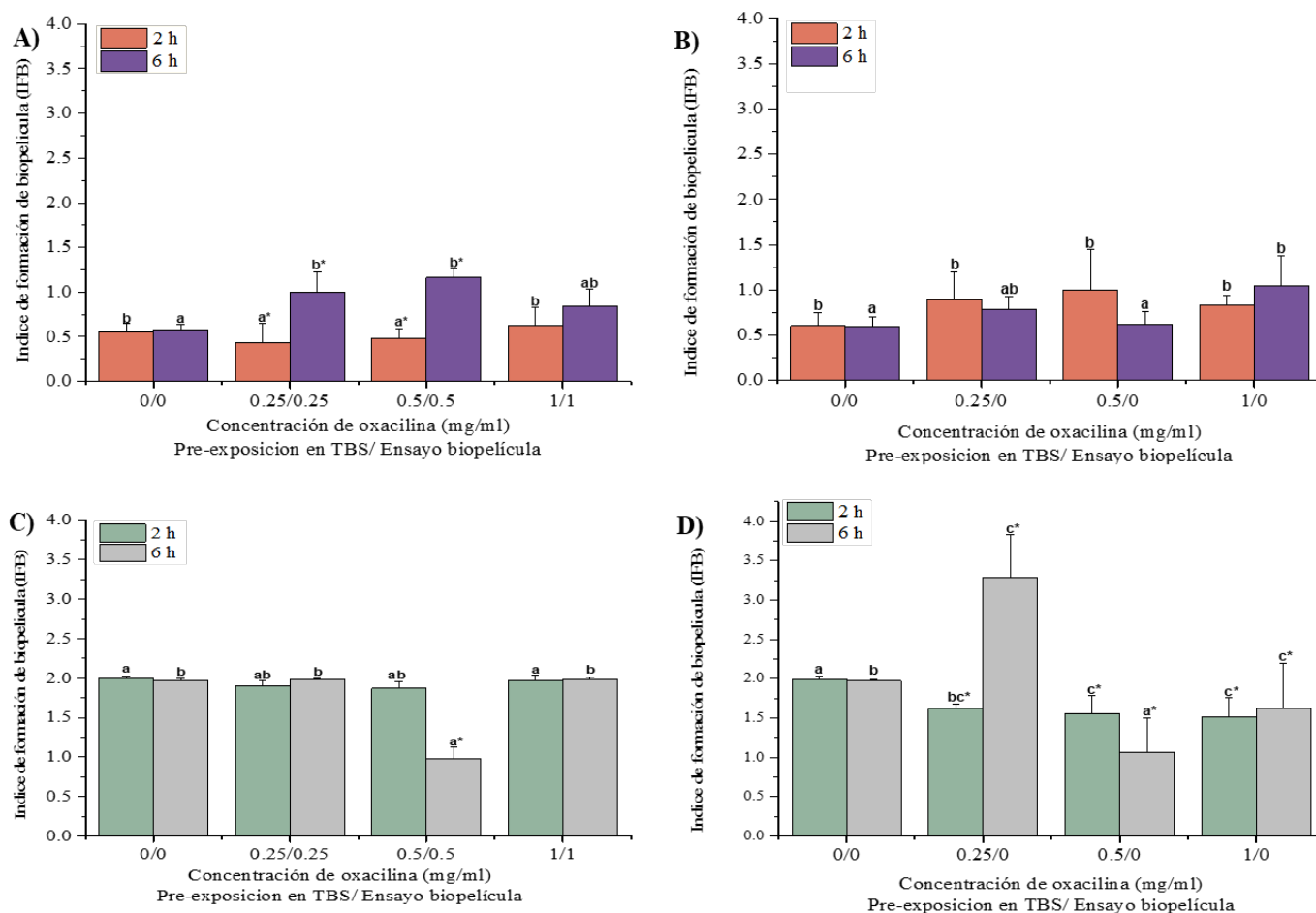


Figura 4. Índice de formación de biopelícula de las cepas de *A. baumannii*. A y C) cultivo con exposición previa a oxacilina en presencia del antibiótico durante el ensayo de biopelícula, B y D) cultivo con exposición previa a la oxacilina sin presencia del antibiótico durante el ensayo de biopelícula.

El IFB de la cepa ATCC 19606 se encontró en el grupo de biopelícula fuerte, excluyendo los tratamientos con 0.5 mg/ml en igual y sin concentración de oxacilina a las 6 h cayendo en el grupo de biopelícula moderada. En cambio, la cepa ATCC BAA 2093 mostró IFBs débiles (0/0, 0.25/0.25, 0.5/0.5, 1/1 mg/ml por 2 h y 0/0, 0.5/0 mg/ml por 6 h) y moderados (0.25/0, 0.5/0, 1/0 mg/ml por 2 h y 0.25/0, 1/0, 0.25/0.25, 0.5/0.5, 1/1 mg/ml por 6 h).

8.6. Efecto de la concentración sub-inhibitoria de la oxacilina sobre los ensayos de transformación de las cepas de *A. baumannii*

Para realizar los ensayos de transformación en condiciones de relativa igualdad de la viabilidad de las células que se pondrían en incubación con el material genético, se decidió que se tomarían en un periodo de preexposición de 8 h con la oxacilina en comparación a las 4 h del cultivo control para que las células estuvieran en su fase logarítmica (ver relación en tabla 10). Así mismo, la respuesta de la eficiencia de transformación se tomó en base a las bacterias viables en el tiempo que respecta a las fases logarítmicas correspondientes, tomándolas como una relación de base para realizar la eficiencia de transformación contra las bacterias viables y por ello logramos ver resultados por arriba del 100%.

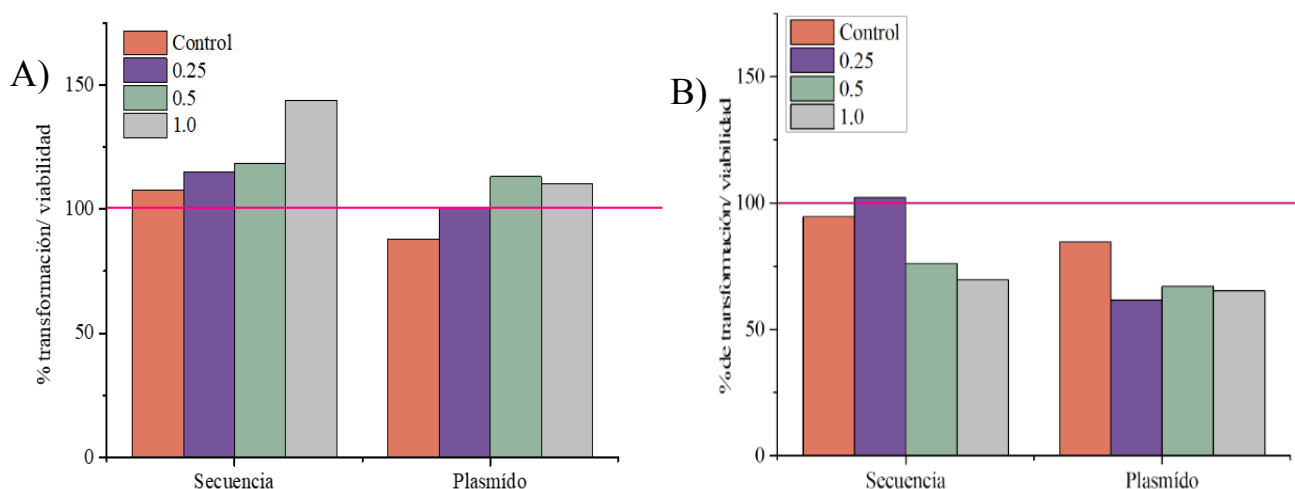


Figura 5. Eficiencia de transformación con secuencia de ADN o plásmido en relación a la viabilidad bacteriana en el periodo de tiempo de preexposición de las diferentes concentraciones de oxacilina A) *A. baumannii* ATCC 19606 transformadas acorde a la viabilidad de las células B) *A. baumannii* ATCC BAA 2093 transformadas acorde a la viabilidad de las células.

La elección de la resistencia elegida para estos ensayos fue espectinomycin (esp), ya que en no se encontró en la literatura o bases de datos que las cepas retadas tuvieran esta resistencia. Además, se realizó un ensayo de PCR punto final para verificar que no llevaran la resistencia naturalmente.

La eficiencia de transformación contra las bacterias viables en *A. baumannii* ATCC 19606 con ambos tipos de material genético de resistencia se reportaron por arriba del 100% en todos los tratamientos, mientras que en la cepa *A. baumannii* ATCC BAA 2093 solo el tratamiento de 0.25 mg/ml estuvo por arriba del 100%. La transformación con secuencia como material genético fue más alta que con el plásmido.

La confirmación de las bacterias transformadas se realizó en diluciones de hasta 1×10^8 UFC/ml, tomándose de 10-15 colonias de cada ensayo para proceder con una PCR punto final de colonia con los cebadores que se muestran en la tabla 3 para el interior de la secuencia de interés (resultados no mostrados). Como requisito las colonias debían tener una distancia entre ellas no menos a 5 mm, para evitar las colonias satélites (por ello la necesidad de las diluciones tan altas).

Tabla 10. Eficiencia de transformación de *A. baumannii* ATCC 19606 Y ATCC BAA 2093 en relación a la viabilidad bacteriana en el periodo de tiempo de preexposición de las diferentes concentraciones de oxacilina.

		4 h	8 h			4 h	8 h		
		Concentración de oxacilina							
		<i>A. baumannii</i> ATCC 19606				<i>A. baumannii</i> ATCC BAA 2093			
	Unidades de medida	Control	0.25 mg/ml	0.5 mg/ml	1.0 mg/ml	Control	0.25 mg/ml	0.5 mg/ml	1.0 mg/ml
Bacterias viables	UFC _{log10}	9.0	7.3	7.1	5.9	9.4	8.3	7.4	6.8
Eficiencia de transformación con secuencia	UFC _{log10} /ng DNA secuencia	9.7	8.4	8.4	8.4	8.9	8.5	5.6	4.7
Eficiencia de transformación con secuencia contra las bacterias viables	%	107.7	114.9	118.5	144.0	94.6	102.2	76.1	69.6
Eficiencia de transformación con plásmido	UFC _{log10} /ng DNA plasmídico	7.9	7.3	8.0	6.5	8.0	5.1	5.0	4.4
Eficiencia de transformación con plásmido contra las bacterias viables	%	87.9	100.2	113.2	110.4	84.7	61.6	67.1	65.2

8.7. Análisis genético de *A. baumannii* con concentración sub-inhibitoria de oxacilina

Con el objetivo de conocer si los tratamientos con oxacilina afectaron los factores de virulencia retados, se procedió a analizar si los cambios podían ser inducidos en la expresión de ciertos genes. En todos los factores de virulencia se analizó la enzima *oxa* que es la encargada de la hidrólisis de los antibióticos β -lactámicos y se realizaron los ensayos en base a gen 16S que fue tomado como constitutivo para el análisis del protocolo.

8.7.1. Expresión de genes relacionados a la motilidad

Como ya se mencionó anteriormente los ensayos de motilidad se hicieron con la bacteria *A. baumannii* ATCC BAA 2093, por ello solo se realizó el análisis genético de la misma, ya que al no contar con motilidad la cepa ATCC 19606 no estaba dentro de los parámetros de este apartado.

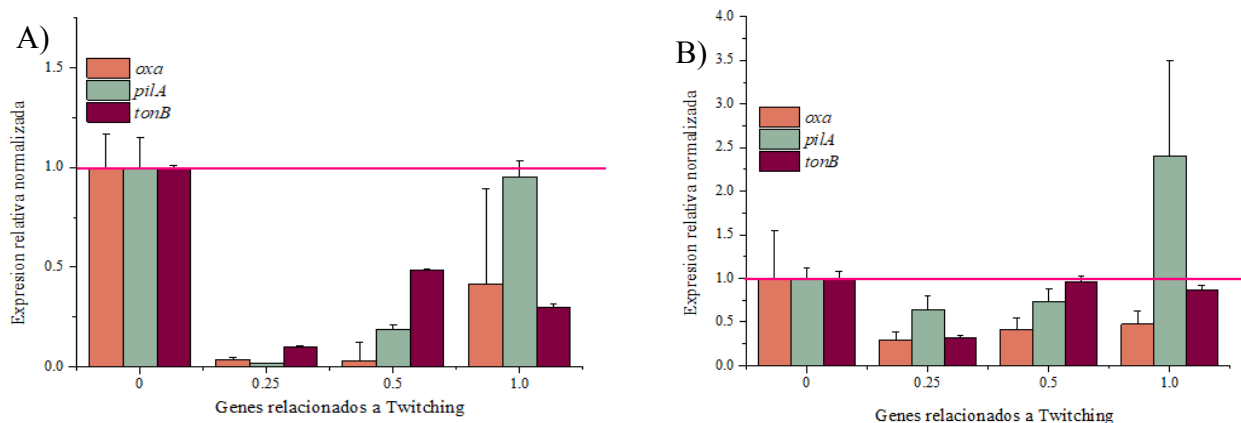


Figura 6. Expresión de los genes relacionados a la motilidad tipo twitching (*pilA* y *tonB*) de *A. baumannii* ATCC BAA 2093 por preexposición a oxacilina, A) 1 h de preexposición, B) 2h de preexposición. El gen constitutivo fue el 16S.

La expresión de los genes *pilA* y *tonB*, relacionados con la motilidad tipo twitching de *A. baumannii* ATCC BAA 2093, se observó suprimida en los tratamientos con oxacilina, tanto en 1 h y 2 h de preexposición, exceptuando *pilA* en 1.0 mg/ml de oxacilina

por 2 h. Mientras que en la motilidad tipo swarming se encontró sobreexpresión de los genes (*ddc* y *dat*) en todos los tratamientos de preexposición por 1 h y 2 h a oxacilina, excluyendo 0.25 mg/ml por 1 h por parte de los genes *oxa*, *ddc* y *dat*.

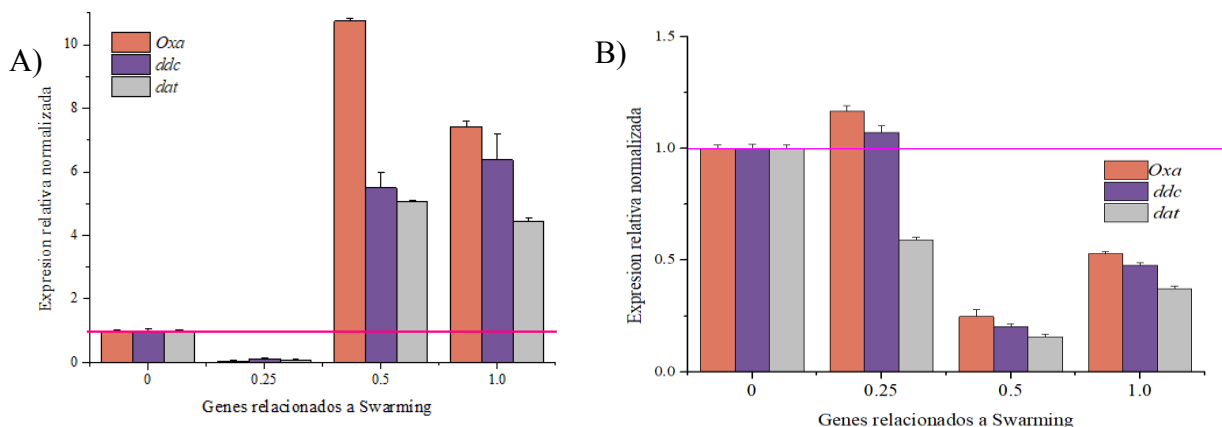


Figura 7. Expresión de los genes relacionados a la motilidad tipo swarming (*ddc* y *dat*) de *A. baumannii* ATCC BAA 2093 en relación al tiempo de preexposición a los tratamientos con oxacilina, A) 1 h de preexposición, B) 2 h de preexposición. El gen constitutivo fue el 16S.

8.7.2. Expresión de genes relacionados al índice de formación de biopelícula

El gen relacionado al IFB que se analizó fue *csuE* encargado de la expresión de la fimbria chaperona-usher, para la unión inicial de la superficie durante la formación de la biopelícula.

En *A. baumannii* ATCC 19606 *csuE* en 2 h se reprimió la expresión en el tratamiento con 1 mg/ml, mientras que en 0.25 y 0.5 hubo sobreexpresión tanto en los tratamientos sin o con igual concentración de antibiótico. El gen *oxa* se suprimió en los tratamientos 0.25/0, 1.0/0, 0.5/0.5 y 1.0/1.0 mg/ml de oxacilina. En 6 h en el tratamiento de igual concentración de oxacilina se vio que los genes se comportaron de igual manera (se suprimió 0.5 y 1.0 mg/ml y se sobre expresó 0.25 mg/ml), en cambio cuando se llevó sin antibiótico el gen *oxa* se sobre expresó en todos los tratamientos al igual que *csuE* excepto con 0.5 mg/ml. La cepa *A. baumannii* BAA ATCC 2093 respondió con sobreexpresión en los tratamientos sin antibiótico (en ambos intervalos de tiempo), exceptuando 0.25 y 0.5 de ambos genes en 6h. Mientras que a igual concentración se

reprimió la expresión en 2h de *csuE* y 1.0 mg/ml en *oxa*. Por otra parte, en 6h se sobreexpresaron ambos genes en todos los tratamientos.

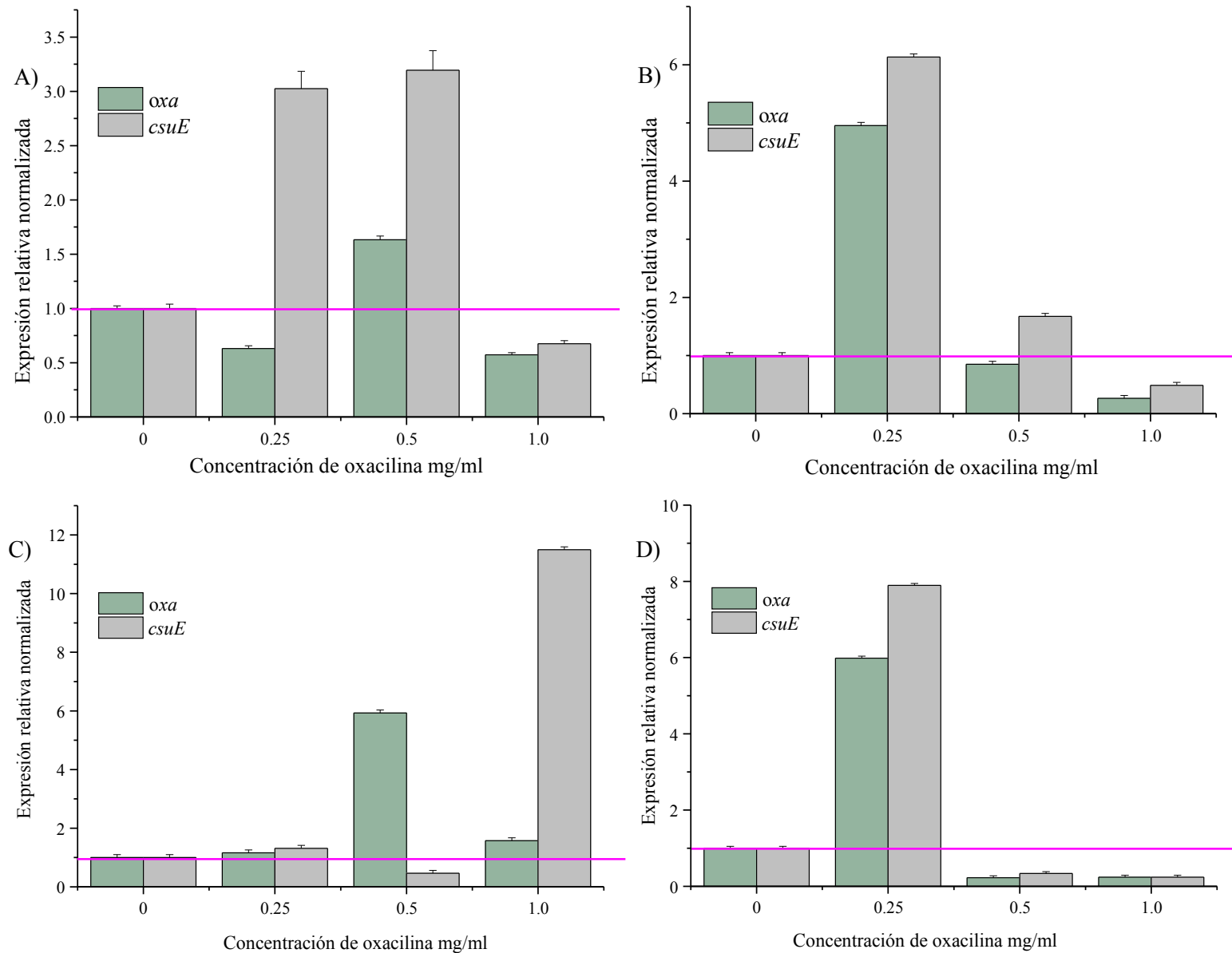


Figura 8. Expresión de los genes relacionados a IFB (*oxa* y *csuE*) de *A. baumannii* ATCC 19606 en relación al tiempo de preexposición de oxacilina y exposición en el ensayo de IFB, A) 2 h, con el ensayo a nula concentración, B) 2 h, con el ensayo a igual concentración, C) 6 h, con el ensayo a nula concentración, D) 6 h, con el ensayo a igual concentración.

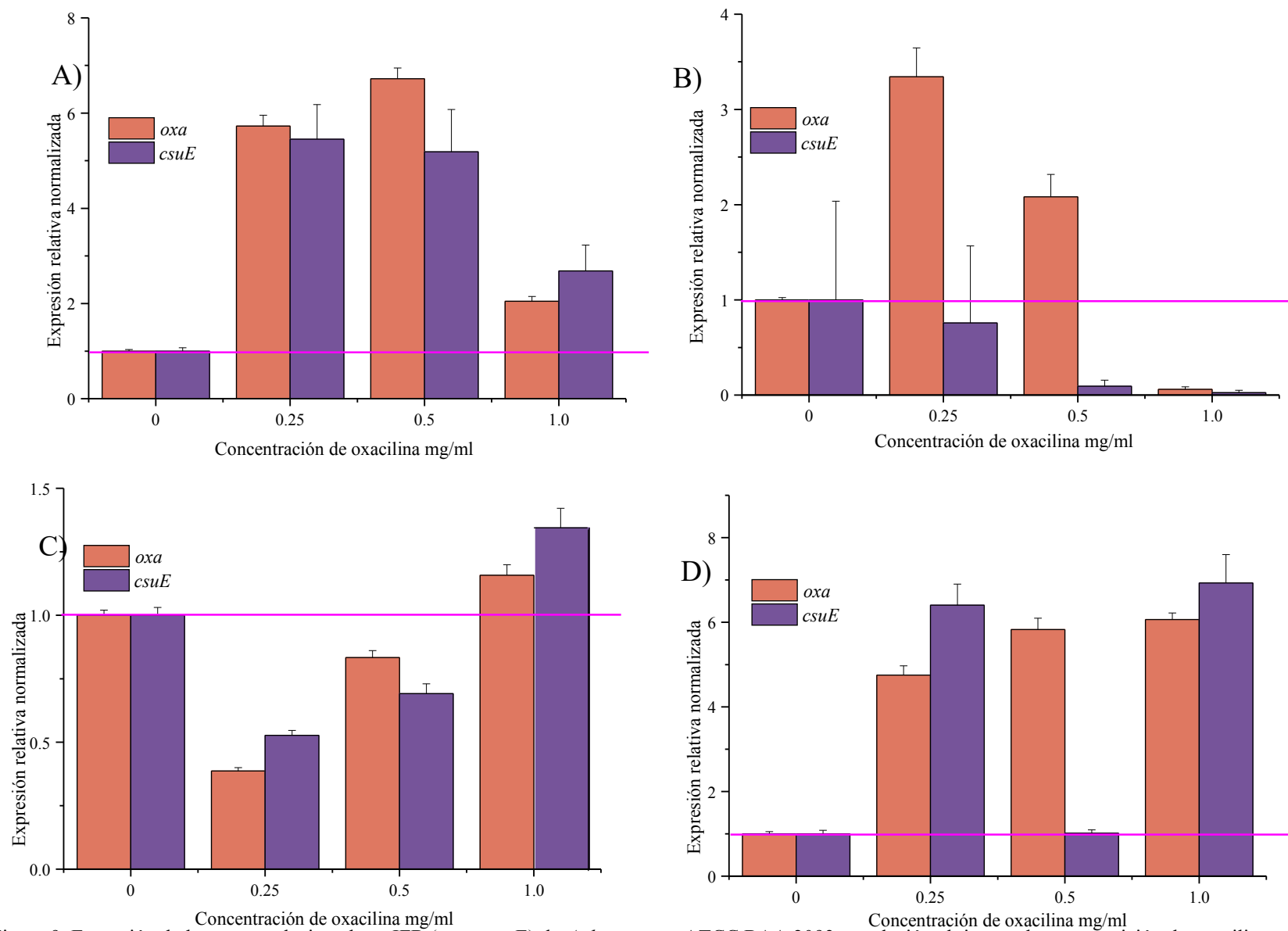


Figura 9. Expresión de los genes relacionados a IFB (*oxa* y *csuE*) de *A. baumannii* ATCC BAA 2093 en relación al tiempo de preexposición de oxacilina y exposición en el ensayo de IFB, A) 2 h, con el ensayo a nula concentración, B) 2 h, con el ensayo a igual concentración, C) 6 h, con el ensayo a nula concentración, D) 6 h, con el ensayo a igual concentración.

9. DISCUSIÓN

Las enzimas β -lactamasas son el mecanismo principal para la resistencia a los antibióticos β -lactámicos. Dentro de la clasificación de las β -lactamasas, encontramos en la clase D a las conocidas como oxacilinasas (OXA) que se encuentran ampliamente distribuidas en bacterias Gram negativas de manera intrínseca, como lo es el caso de *A. baumannii* (Bush, 2018; Pandey *et al.*, 2021). Las enzimas OXA tienen una amplia diversidad genética, y por ello, presenta una amplia heterogeneidad en el espectro de la hidrólisis de los antibióticos β -lactámicos (Poirel *et al.*, 2010). El impacto de estas enzimas en diferentes rutas metabólicas con relación de la virulencia no se encontró descrito en la literatura, siendo actualmente un tema de gran relevancia debido a la cantidad de antibióticos residuales y el aumento de genes de resistencia.

Al conocer que ambas cepas se caracterizan por tener resistencia a la oxacilina la determinación de la CMB fue un reto, pues las cepas se comportaron de manera muy distinta; obteniendo CMBs en las cepas de *A. baumannii* ATCC BAA 2093 y ATCC 19606 a 5 ± 0 y 15 ± 0 mg/ml respectivamente. La cepa ATCC 19606 tuvo 1.5 veces más resistencia a la oxacilina que la cepa ATCC BAA-2093. Dentro de la literatura no encontramos CMBs de la oxacilina reportadas para las cepas de *A. baumannii* que trabajamos. La diferencia en la concentración de oxacilina que pudieron resistir puede deberse al perfil de enzima OXA que tiene cada cepa, siendo que la cepa ATCC BAA 2093 tiene *blaOXA-89*, perteneciente a la familia de las OXA-51, mientras que la cepa ATCC 19606 tiene *blaOXA133*, pertenece a la familia de las OXA 23; siendo las β -lactamasas similares a OXA-51 que tienen un patrón de resistencia naturalmente pequeño, mientras que las OXA-23 se han reportado que llegan a tener una actividad carbapenemasa importante (Figueiredo *et al.*, 2009).

Para proceder con la caracterización de los distintos factores de virulencia bajo los efectos de la inducción de β -lactamasas OXA, se seleccionaron concentraciones subinhibitorias de oxacilina y se probaron para verificar si el impacto en la viabilidad de las células era importante. La viabilidad en 0.25, 0.5 y 1.0 mg/ml de oxacilina fue similar, sin embargo, se vio afectada hasta en 2.5 logaritmos con respecto al control en el

tratamiento más alto (1.0 mg/ml). Hernández-Torres *et al.* (2012) determinaron CMI's de 16 mg/ml de imipenem *in vitro* que no afectaron la viabilidad de *A. baumannii* aislado de pacientes del hospital universitario virgen de la Arrixaca.

Primero, se evaluó la motilidad de las cepas al estar en un cultivo fresco ajustado y expuesto por 1 y 2 h al antibiótico antes del ensayo en placa de agar suave sin antibiótico. La cepa ATCC 19606, como ya se había mencionado con anterioridad se encuentra reportada en la literatura como no móvil (Biswas *et al.*, 2019). La motilidad twitching y swarming de la cepa ATCC BAA 2093 se vio generalmente disminuida a medida que aumentó la concentración de oxacilina a la cual fue pre-expuesta. Así como Abirami *et al.*, (2021) reportaron que la motilidad twitching de *A. baumannii* MTCC 9829 disminuyó con pyrogallol. En cuanto a la motilidad swarming se encontraron diversos reportes en la literatura, pero discrepan ya que las condiciones experimentales difieren y este tipo de motilidad es muy sensible en cuanto a la respuesta de la bacteria, como luz, salinidad, hierro, lipopolisacáridos y detección de quórum (Abirami *et al.*, 2021; Mea *et al.*, 2021; Mussi *et al.*, 2010).

La producción de exopolisacáridos brinda protección al microorganismo contra diferentes tipos de estrés físico, químico y biológico, además de brindar anclaje, soporte e inicio de formación de biopelículas e interacciones entre células (Corzo *et al.*, 2015; Whitfield *et al.*, 2020). Al cuantificar los EPS en ambas cepas de *A. baumannii* se encontró aumento de producción con el tiempo, sin embargo, también se observó que la cantidad disminuyó en relación a la concentración de antibiótico. Choudhary *et al.*, (2022) encontraron que se obtuvo una reducción de los EPS con el eugenol y el geraniol sobre varias cepas de *A. baumannii* incluyendo ATCC 19606.

La biopelícula en *A. baumannii* es de uno de los factores de virulencia de mayor importancia según lo reportado en la literatura, ya que la bacteria mediante esta, logra protegerse de los factores ambientales e incluso de antibióticos (Longo *et al.*, 2014). Al realizar los ensayos de biopelículas con diferentes concentraciones de oxacilina, la cepa ATCC 19606 produjo biopelícula fuerte (al igual que el control), en tanto que la cepa ATCC BAA 2093 produjo biopelícula de débil a moderada (siendo el control productor débil, por lo que aumentó la producción en algunos casos). Existen reportes que en

aislados clínicos de *A. baumannii* MDR la azitromicina disminuyó la producción de la biopelícula con respecto al control (Camacho-Ortiz et al., 2021).

La propagación y el aumento de la resistencia de *A. baumannii* nos llevó a evaluar su capacidad de transformación en las diferentes concentraciones de oxacilina. Las células se probaron en tiempos en el que las células se encontraran en su fase logarítmica ya que durante ella aumenta la eficiencia de transformación (Tsen, et al., 2002). Además, se ha demostrado que las bacterias del género *Acinetobacter* son naturalmente competentes (de Vries & Wackernagel, 2002). Se probó la transformación con material genético en secuencia de resistencia a esp o plásmido que contenían la misma resistencia. *A. baumannii* ATCC 19606 se transformó por arriba del 100% en las diferentes concentraciones de oxacilina, mientras que en *A. baumannii* ATCC BAA 2093 solo el tratamiento de 0.25 mg/ml con la secuencia de resistencia transformó por arriba del 100%. Con el material genético de secuencia de resistencia se observó mayor transformación que con los plásmidos, esto planteamos que fue favorecido por la interacción entre las proteínas implicadas en la recombinación homóloga *recA* y OXA-69 (también perteneciente a la familia de OXA 23), además de tener un menor número de pb.

Como observamos alteraciones en las expresiones fenotípicas de los factores de virulencia retados, procedimos a analizar si los cambios podían ser inducidos en la expresión de ciertos genes. Primeramente, se analizó la motilidad twitching; se estudió el gen *pilA* que codifica a una subunidad en la biogénesis del pili tipo IV que coordina el movimiento multicelular (Dhabaan et al., 2015). La motilidad de *A. baumannii* ATCC BAA 2093 con los tratamientos de oxacilina en general fue menor que el control, así como se suprimió el gen *pilA* coincidiendo con la respuesta que Corral et al. (2021) encontraron en *pilE* quien, al ser regulado a la baja, afectó la motilidad, así como la relación directa que tiene *tonB* con la motilidad siendo igualmente suprimido en mutantes espontáneos de *A. baumannii* MAR002 resistente a la rifampicina.

En cambio, la motilidad tipo swarming se ha reportado que es mediada por la síntesis de 1,3-diaminopropano y los genes que contribuyen a la síntesis de este compuesto son *ddc* y *dat* (Skiebe et al., 2012). Aunque en general encontramos sobreexpresión de los genes involucrados en este tipo de motilidad, el fenotipo se encontró con una respuesta

por debajo del control (con una excepción), dejándonos sin una respuesta clara de la relación de estos genes y la interacción de la oxacilina. Dentro de la literatura no se encontró algún ensayo directamente sobre los genes, sin embargo, Abirami *et al.*, (2021) reportaron que la motilidad swarming de *A. baumannii* MTCC 9829 se vió totalmente suprimida con pyrogallol.

Por otra parte, para el análisis de los genes relacionados con la biopelícula, se seleccionó al gen *CsuE* que es parte del sistema de secreción *CsuAB-A-B-C-D-E* cuyo producto forma un haz similar a un pili siendo importante para el anclaje e inicio de la construcción de la biopelícula (Tomaras *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2019). La cepa ATCC 19606 mostró sobreexpresión del gen *CsuE* en comparación al control en 7 de 12 ensayos, mientras que ATCC BAA 2093 en 6 de 12 ensayos (siendo en igualdad de antibiótico 5 de ellos), así como se vio que fenotípicamente ATCC 19606 resultó ser formadora de biopelícula fuerte; Yang *et al.*, (2019) encontraron que en cepas aisladas de *A. baumannii* que codifican los genes *bap*, *blaP_{OR}*, *ompA* y *csuE* tienden a formar biopelícula más fuerte que los que no los contienen en su genoma, en dicho estudio el gen *csuE* se encontró en el 32.5% de los aislados que producen biopelícula fuerte y en 68.8% de los aislados totales.

Los resultados del análisis de expresión de genes nos dejan con interrogantes, para analizar un mayor número de genes relacionados con los factores de virulencia que estudiamos, para conocer como el tratamiento con la oxacilina interactúa con las rutas metabólicas de los mismos.

10. CONCLUSIONES

1. La CMB de las cepas de *A. baumannii* ATCC BAA 2093 y ATCC 19606 fue 5 ± 0 y 15 ± 0 mg/ml respectivamente.
2. La viabilidad de las cepas de *A. baumannii* ATCC BAA 2093 y ATCC 19606 se vio afectada hasta en 2.5 logaritmos con concentraciones sub-CMB de oxacilina.
3. La cepa *A. baumannii* ATCC BAA 2093 indujo la motilidad a 0.25 mg/ml de oxacilina.
4. La producción de exopolisácaridos totales se afectó en todas las concentraciones de oxacilina analizadas en ambas cepas de *A. baumannii*.
5. La cepa ATCC BAA 2093 pre-expuesta a 0.25 y 0.5 mg/ml en igual (6 h) o sin (2 h) antibiótico mostró hasta 0.7 veces ($P<0.5$) más producción de biopelícula con respecto al control.
6. *A. baumannii* ATCC 19606 transformó en mayor frecuencia al exponerse a concentraciones subinhibitorias de oxacilina.
7. Los genes relacionados a motilidad tipo twitching de *A. baumannii* ATCC BAA 2093 fueron suprimidos, mientras que los relacionados a motilidad tipo swarming se sobre expresaron al exponerse a concentraciones sub inhibitorias de oxacilina.
8. Los genes relacionados a la producción de biopelícula se encontraron alterados en ambas cepas.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera-Calzadilla, Y., Díaz-Morales, Y., Guerra-Martínez, M., Sánchez-Álvarez, M., & Martínez-Frómeta, M. (2019). Aislamientos de *Acinetobacter spp.* en infecciones asociadas a la asistencia sanitaria. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 48(3), 505-518. doi:10.483505/rcdmm.01400.0100002
- Abarca, G., & Herrera, M. L. (2001). Betalactamasas: su importancia en la clínica y su detección en el laboratorio. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, 36(1-2), 77-104. ISSN 1017-8546
- Abirami, G., Durgadevi, R., Velmurugan, P., & Ravi, A. V. (2020). Gene expressing analysis indicates the role of Pyrogallol as a novel antibiofilm and antivirulence agent against *Acinetobacter baumannii*. *Archives of Microbiology*. doi:10.1007/s00203-020-02026-3
- Al Atrouni, A., Joly-Guillou, M. L., Hamze, M., & Kempf, M. (2016). Reservoirs of Non-*baumannii* *Acinetobacter* Species. *Frontiers in Microbiology*. 7(49), 1-12. doi:10.3389/fmicb.2016.00049
- Alhajlan, M., Alhariri, M., & Omri, A. (2013). Efficacy and safety of liposomal clarithromycin and its effect on *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 57(6), 2694–2704. doi:10.1128/AAC.00235-13
- Amorim, A.M., & Nascimento, J.D. (2017). *Acinetobacter*: an underrated foodborne pathogen? *Journal of Infection in Developing Countries*, 11(2), 111–114. doi:10.3855/jidc.8418
- Averhoff, B., & Friedrich, A. (2003). Type IV pili-related natural transformation systems: DNA transport in mesophilic and thermophilic bacteria. *Archives of Microbiology*, 180(6), 385–393. doi:10.1007/s00203-003-0616-6

- Ávila-Novoa, M. G., Solís-Velázquez, O. A., Rangel-López, D. E., González-Gómez, J. P., Guerrero-Medina, P. J., & Gutiérrez-Lomelí, M. (2019). Biofilm formation and detection of fluoroquinolone- and carbapenem-resistant genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal Canadien des Maladies Infectieuses et de la Microbiologie Médicale*, Vol. 2019, 3454907. doi: 10.1155/2019/3454907
- Bang, R. L., Sharma, P., Gang, R. K., Ghoneim, I. E., & Ebrahim, M. K. (2000). Burn mortality during 1982 to 1997 in Kuwait. *European Journal of Epidemiology*, 16(8), 731-739. doi: 10.1023/A:1026702201874
- Barnhart, M. M., & Chapman, M. R. (2006). Curli biogenesis and function. *Annual Review of Microbiology*, 60, 131–147. doi: 10.1146/annurev.micro.60.080805.142106
- Baumann P. (1968). Isolation of *Acinetobacter* from soil and water. *Journal of Bacteriology*, 96(1), 39–42. doi: 10.1128/jb.96.1.39-42.1968
- Benisty, S., Ben-Jacob, E., Ariel, G., & Beér, A. (2015). Antibiotic-induced anomalous statistics of collective bacterial swarming. *Physical Review Letters*. 114 (1) doi: 10.1103/PhysRevLett.114.018105.
- Bergogne-Bérézin, E., & Towner, K. J. (1996). *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clinical Microbiology Reviews*, 9(2), 148–165. Rev. 9(2):148-65. doi: 10.1128/CMR.9.2.148
- Berlau, J., Aucken, H. M., Houang, E., & Pitt, T. L. (1999). Isolation of *Acinetobacter* spp. including *A. baumannii* from vegetables: implications for hospital-acquired infections. *The Journal of Hospital Infection*, 42(3), 201–204. doi: 10.1053/jhin.1999.0602
- Biswas, I., Machen, A., & Mettlach, J. (2019). *In vitro* motility assays for *Acinetobacter* species. *Graduate Texts in Mathematics*, 177–187. doi:10.1007/978-1-4939-9118-1_17
- Boehm, A., Steiner, S., Zaehring, F., Casanova, A., Hamburger, F., Ritz, D., Keck, W., Ackermann, M., Schirmer, T. & Jenal, U. (2009). Second messenger signaling governs

- Escherichia coli* biofilm induction upon ribosomal stress. *Molecular Microbiology* 72(6):1500-1516. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06739.x
- Bouvet, P. J., & 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 description of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. *Systematic and applied microbiology*, 36:228-240. doi:10.1099/00207713-36-2-228
- Brady, M. F., Jamal, Z., & Pervin, N. (2021). *Acinetobacter*. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. PMID: 28613535.
- Brahmi, S., Touati, A., Cadiere, A., Djahmi, N., Pantel, A., Sotto, A., Lavigne, J.P., Dunyach-Remy, C., (2016). First Description of Two Sequence Type 2 *Acinetobacter baumannii* isolates carrying OXA-23 carbapenemase in pagellus acarne fished from the mediterranean sea near Bejaia, Algeria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 60, 2513-2515.
- Burmølle, M., Webb, J. S., Rao, D., Hansen, L. H., Sørensen, S. J., & Kjelleberg, S. (2006). Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6), 3916–3923. doi: 10.1128/AEM.03022-05
- Bush, K. (2018). Past and present perspectives on β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(10), e01076-18. doi: 10.1128/AAC.01076-18
- Cárdenas-Perea, M. E., Cruz, O., Gándara-Ramírez, J. & Pérez-Hernández, M. (2014). Factores de virulencia bacteriana: la “inteligencia” de las bacterias. *Elementos* 94, 35-43.
- Carr, E. L., Kämpfer, P., Patel, B., Gürtler, V., & Seviour, R. J. (2003). Seven novel species of *Acinetobacter* isolated from activated sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(4), 953–963. doi: 10.1099/ijs.0.02486-0

- Carvalheira, A., Casquete, R., Silva, J., & Teixeira, P. (2017). Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* spp. isolated from meat. *International journal of food microbiology*, 243, 58–63. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.12.001
- Carvalheira, A., Gonzales-Siles, L., Salva-Serra, F., Lindgren, A., Svensson-Stadler, L., Thorell, K., Piñeiro-Iglesias, B., Karlsson, R., Silva, J. & Teixeira, P. (2020) *Acinetobacter portensis* sp. nov. and *Acinetobacter guerraee* sp. nov., isolated from raw meat. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 70:4544–4554 doi:10.1099/ijsem.0.004311
- Chapartegui-González, I., Lázaro-Díez, M., Bravo, Z., Navas, J., Icardo, J.M., Ramos-Vivas, J. (2018). *Acinetobacter baumannii* maintains its virulence after long-time starvation. PLoS ONE 13(8): e0201961. doi:10.1371/journal.pone.0201961
- Chaudhary, H.J., Peng, G., Hu, M., yumei, H., Lijuan, Y., Yan, L. & Zhiyuan, T. (2012). Genetic diversity of endophytic diazotrophs of the wild rice, *Oryza alta* and identification of the new diazotroph, *Acinetobacter oryzae* sp. nov. *Microbial ecology* 63, 813–821. doi: 10.1007/s00248-011-9978-5
- Chen, L. (2004). VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Research*. 33(Database issue) D325–D328. doi:10.1093/nar/gki008
- Chen, I., & Dubnau, D. (2004). DNA uptake during bacterial transformation. *Nature reviews. microbiology*, 2(3), 241–249. doi: 10.1038/nrmicro844
- Chenoweth, C.E., & Saint, S. (2016). Urinary tract infections. *Infectious Disease Clinics of North America*, 30 (4), 869-885. doi: 10.1016/j.idc.2016.07.007
- Choudhary, M., Shrivastava, R., & Vashist, J. (2022). Eugenol and geraniol impede *Cs*-pilus assembly and evades multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* biofilms: In-vitro and *in silico* evidence. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 636(Pt 2), 10–17. doi:10.1016/j.bbrc.2022.10.095
- Christensen, E. G., Gram, L., & Kastbjerg, V. G. (2011). Sublethal triclosan exposure decreases susceptibility to gentamicin and other aminoglycosides in *Listeria*

- monocytogenes*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(9), 4064–4071. doi:10.1128/AAC.00460-11
- Colquhoun, J.M., Farokhyfar, M., Hutcheson, A. R., Anderson, A., Bethel, C. R., Bonomo, R. A., Clarke, A. J., & Rather, P. N. (2021). La sobreexpresión de OXA-23 β -lactamasa en *Acinetobacter baumannii* impulsa cambios fisiológicos que resultan en nuevas vulnerabilidades genéticas. *mBio*, 12(6), e0313721. doi:10.1128/mBio.03137-21
- Corral, J., Pérez-Varela, M., Sánchez-Osuna, M., Cortés, P., Barbé, J., & Aranda, J. (2021). Importance of twitching and surface-associated motility in the virulence of *Acinetobacter baumannii*. *Virulence*, 12(1), 2201–2213. doi:10.1080/21505594.2021.1950268
- Corzo, N., Alonso, J. L., Azpiroz, F., Calvo, M. A., Cirici, M., Leis, R., Lombó, F., Mateos-Aparicio, I., Plou, F. J., Ruas-Madiedo, P., Rúperez, P., Redondo-Cuenca, A., Sanz, M. L., & Clemente, A. (2015). Prebiotics: concept, properties and beneficial effects. *Nutricion Hospitalaria*, 31 Suppl 1, 99–118. doi:10.3305/nh.2015.31.sup1.8715
- Cray, J. A., Bell, A. N., Bhaganna, P., Mswaka, A. Y., Timson, D. J., & Hallsworth, J. E. (2013). La biología de la dominancia del hábitat; ¿pueden los microbios comportarse como malas hierbas?. *Biotecnología Microbiana*, 6(5), 453–492. doi: 10.1111/1751-7915.12027
- de Vries, J., & Wackernagel, W. (2002). Integration of foreign DNA during natural transformation of *Acinetobacter* sp. by homology-facilitated illegitimate recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(4), 2094–2099. doi:10.1073/pnas.042263399
- Dhabaan, G. N., AbuBakar, S., Cerqueira, G. M., Al-Haroni, M., Pang, S. P., & Hassan, H. (2015). El tratamiento con imipenem induce la expresión de genes y fenotipos importantes en un aislado resistente de *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobianos y Quimioterapia*, 60(3), 1370–1376. doi:10.1128/AAC.01696-15)

- Du, Y., Li, T., Wan, Y., Long, Q., & Liao, P. (2014). Signal molecule-dependent quorum-sensing and quorum-quenching enzymes in bacteria. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 24(2), 117–132. doi: 10.1615/critreveukaryotgeneexpr.2014008034
- Egorov, A. M., Ulyashova, M. M., & Rubtsova, M. Y. (2018). Bacterial Enzymes and Antibiotic Resistance. *Acta Naturae*, 10(4), 33–48.
- Elbehiry, A., Marzouk, E., Moussa, I. M., Dawoud, T. M., Mubarak, A. S., Al-Sarar, D., Alsubki, R. A., Alhaji, J. H., Hamada, M., Abalkhail, A., A Hemeg, H., & Zahran, R. N. (2021). *Acinetobacter baumannii* as a community foodborne pathogen: Peptide mass fingerprinting analysis, genotypic of biofilm formation and phenotypic pattern of antimicrobial resistance. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(1), 1158–1166. doi: 10.1016/j.sjbs.2020.11.052
- Eliopoulos, G.M., Maragakis, L.L., Perl, T.M. (2008). *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options, *Clinical Infectious Diseases*. 46 (8), 1254–1263. doi: 10.1086/529198
- Elliott, D., Burns, J. L., & Hoffman, L. R. (2010). Exploratory study of the prevalence and clinical significance of tobramycin-mediated biofilm induction in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(7), 3024–3026. doi:10.1128/AAC.00102-10
- Elnar, A. G., Kim, M. G., Lee, J. E., Han, R. H., Yoon, S. H., Lee, G. Y., Yang, S. J., & Kim, G. B. (2020). *Acinetobacter pullorum* sp. nov., isolated from chicken meat. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(4), 526–532. doi: 10.4014/jmb.2002.02033.
- Espinal, P., Martí, S., & Vila, J. (2012). Effect of biofilm formation on the survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *The Journal of Hospital Infection*, 80(1), 56–60. doi: 10.1016/j.jhin.2011.08.013
- Fattahian, Y., Rasooli, I., Mousavi Gargari, S. L., Rahbar, M. R., Darvish Alipour Astaneh, S., & Amani, J. (2011). Protection against *Acinetobacter baumannii* infection via its functional deprivation of biofilm associated protein (Bap). *Microbial Pathogenesis*, 51(6), 402–406. doi: 10.1016/j.micpath.2011.09.004.

- Fei-Ju Li, Lora Starrs, Gaetan Burgio, Tug of war between *Acinetobacter baumannii* and host immune responses, *Pathogens and Disease*, Volume 76, Issue 9, December 2018, ftz004, doi: 10.1093/femspd/ftz004
- Fernández, A., Pérez, A., Ayala, J. A., Mallo, S., Rumbo-Feal, S., Tomás, M., Poza, M., & Bou, G. (2012). Expression of OXA-type and SFO-1 β -lactamases induces changes in peptidoglycan composition and affects bacterial fitness. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(4), 1877–1884. doi:10.1128/AAC.05402-11
- Figueiredo, S., Poirel, L., Papa, A., Koulourida, V., & Nordmann, P. (2009). Overexpression of the naturally occurring blaOXA-51 gene in *Acinetobacter baumannii* mediated by novel insertion sequence ISAb9. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(9), 4045–4047. doi:10.1128/AAC.00292-09
- Frank, K.L., Reichert, E.J., Piper, K.E., Patel, R. (2007). In vitro effects of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of *Staphylococcus lugdunensis* clinical isolates. *Antimicrobial Agents Chemother.* 51(3):888-895. doi:10.1128/AAC.01052-06
- Gaddy, J. A., Tomaras, A. P., & Actis, L. A. (2009). The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells. *Infection and Immunity*, 77(8), 3150–3160. doi: 10.1128/IAI.00096-09
- García-Heredia, A., García, S., Merino-Mascorro, J. Á., Feng, P., & Heredia, N. (2016). Natural plant products inhibits growth and alters the swarming motility, biofilm formation, and expression of virulence genes in enteroaggregative and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Food Microbiology*, 59, 124–132. doi:10.1016/j.fm.2016.06.001
- Glew, R.H., Moellering, R.C., & Kunz, L.J. (1977). Infections with *Acinetobacter calcoaceticus* (*Herellea vaginicola*): Clinical and laboratory studies, *Medicine*. 56 (2) 79-97. doi: 10.1097/00005792-197703000-00001
- Gordon, N. C., & Wareham, D. W. (2010). Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35(3), 219–226. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2009.10.024

- Hamilton-Miller, J.M. & Shah, S., (2001). Identity and antibiotic susceptibility of enterobacterial flora of salad vegetables. *International Journal of Antimicrobial Agents* 18, 81-83. doi: 10.1016/s0924-8579(01)00353-3
- Han, R. H., Lee, J. E., Yoon, S. H., & Kim, G. B. (2020). *Acinetobacter pullicarnis* sp. nov. isolated from chicken meat. *Archives of Microbiology*, 202(4), 727–732. doi: 10.1007/s00203-019-01785-y
- Harding, C. M., Tracy, E. N., Carruthers, M. D., Rather, P. N., Actis, L. A., & Munson, R. S., Jr. (2013). *Acinetobacter baumannii* strain M2 produces type IV pili which play a role in natural transformation and twitching motility but not surface-associated motility. *mBio*, 4(4), e00360-13. doi: 10.1128/mBio.00360-13
- Hernández, A., García, E., Yagüe, G. & Gómez, J. (2010). *Acinetobacter baumannii* multirresistente: situación clínica actual y nuevas perspectivas. *Revista española Quimioterapia*. 23(1):12-19
- Hernández-Torres, A., García-Vázquez, E., Gómez, J., Canteras, M., Ruiz, J., & Yagüe, G. (2012). Multidrug and carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections: Factors associated with mortality. *Medicina Clínica*, 138(15), 650–655. doi:10.1016/j.medcli.2011.06.024
- Hoffman, L.R., D'Argenio, D.A., MacCoss, M.J. (2005). Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature*. 436(7054): 1171-1175. doi:10.1038/nature03912
- Houang, E. T., Chu, Y. W., Leung, C. M., Chu, K. Y., Berlau, J., Ng, K. C., & Cheng, A. F. (2001). Epidemiology and infection control implications of *Acinetobacter* spp. in Hong Kong. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(1), 228–234. doi: 10.1128/JCM.39.1.228-234.2001
- Howard, A., O'Donoghue, M., Feeney, A., & Sleator, R. D. (2012). *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. *Virulence*, 3(3), 243–250. doi: 10.4161/viru.19700

- Jawad, A., Heritage, J., Snelling, A. M., Gascoyne-Binzi, D. M., & Hawkey, P.M. (1996). Influence of relative humidity and suspending menstrua on survival of *Acinetobacter* spp. on dry surfaces. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(12), 2881–2887. doi: 10.1128/jcm.34.12.2881-2887.1996
- Jiayuan, Q., Yu, F., Xiaojun, L., Zhiyong, Z. & Rup, L. (2021) Precise Species Identification for *Acinetobacter*: a Genome-Based Study with Description of Two Novel *Acinetobacter* Species. *mSystems* 6: e00237-21. doi: 10.1128/mSystems.00237-21.
- Joly-Guillou, M.L. (2005). Impacto clínico y patogenicidad de *Acinetobacter*. *Microbiología clínica e infección: la publicación oficial de la Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas*, 11(11),868–873. doi: 10.1111/j.1469-0691.2005.01227.x
- Joo, H.-S., & Otto, M. (2012). Molecular basis of in vivo biofilm formation by bacterial pathogens. *Chemistry & biology*. 19, 1503–1513. doi: 10.1016/j.chembiol.2012.10.022
- Kaplan, J.B. (2011). Antibiotic-Induced biofilm formation. *The International Journal of Artificial Organs*. 34 (9): 737-751. doi: 10.5301/ijao.5000027
- Kaplan, J. B., Izano, E. A., Gopal, P., Karwacki, M. T., Kim, S., Bose, J. L., Bayles, K. W., & Horswill, A. R. (2011). Low levels of β -lactam antibiotics induce extracellular DNA release and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *mBio*, 3(4), e00198-12. doi:10.1128/mBio.00198-12
- Kaplan, J.B., Jabbouri, S., Sadovskaya, I. (2011). Extracellular DNA dependent biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* RP62A in response to subminimal inhibitory concentrations of antibiotics. *Research in microbiology*.162(5):525-541. doi: 10.1016/j.resmic.2011.03.008
- Lautrop, H. (1974). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Williams & Wilkins Co., Baltimore, MD. 17-18.
- Linares, J.F., Gustafsson, I., Baquero, F., Martinez, J.L. (2006). Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences of the United States of America*. 103(51):19484-19489. doi:10.1073/pnas.0608949103
- Loehfelm, T. W., Luke, N. R., & Campagnari, A. A. (2008). Identification and characterization of an *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein. *Journal of Bacteriology*, 190(3), 1036–1044. doi: 10.1128/JB.01416-07
- Longo, F., Vuotto, C., & Donelli, G. (2014). Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. *The New Microbiologica*, 37(2), 119–127.
- López, R. (2011). Nuevas alternativas terapéuticas frente a *Acinetobacter baumannii*. Estudios pre-clínicos de péptidos híbridos de cecropina A-melitina, una quinolona de nueva generación (UB-8902) y ácido clavulánico. [Tesis doctoral, Universidad de Sevilla] Sevilla, España.
- López, S. & López-Brea, M. (2000). ¿Qué debemos saber acerca de las infecciones por *Acinetobacter baumannii*?. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 18(3) 153-156
- Maragakis, L.L., & Perl, T. M. (2008). *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. *Clinical Infectious Diseases: an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 46(8), 1254–1263. doi: 10.1086/529198
- Martínez-Pellús, A., Ruíz, J., Jaime, F., Simarro, E. & Fernández, A. (2002). Incidencia de colonización e infección por *Acinetobacter baumannii* en una UCI con situación de endemia. Análisis de factores de riesgo mediante un estudio de vigilancia. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 20 (5): 194-199.
- Mattick, J. S. (2002). Type IV pili and twitching motility. *Annual Review of Microbiology*, 56, 289–314. doi:10.1146/annurev.micro.56.012302.160938
- McConnell, M.C., Actis, L. & Pachón, J. (2013). *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiology Reviews*. 37 (2) :130–155. doi: 10.1111/j.1574-6976.2012. 00344.x

- Mea, H. J., Yong, P. V. C., & Wong, E. H. (2021). An overview of *Acinetobacter baumannii* pathogenesis: Motility, adherence and biofilm formation. *Microbiological Research*, 247, 126722. doi:10.1016/j.micres.2021.126722
- Metan, G., Alp, E., Aygen, B., & Sumerkan, B. (2007). *Acinetobacter baumannii* meningitis in post-neurosurgical patients: clinical outcome and impact of carbapenem resistance. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(1), 197–199. doi: 10.1093/jac/dkm181
- Metzgar, D., Bacher, J.M., Pezo, V., Reader, J., Döring, V., Schimmel, P., Marlière, P., & de Crécy-Lagard, V. (2004). *Acinetobacter* spp. ADP: an ideal model organism for genetic analysis and genome engineering. *Nucleic Acids Research*, 32 (19), 5780-5790. doi: 10.1093/nar/gkh881
- Mirani, Z.A. & Jamil, N. (2011) Effect of sub-lethal doses of vancomycin and oxacillin on biofilm formation by vancomycin intermediate resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of basic microbiology*, 51(2):191-195. doi:10.1002/jobm.201000221
- Moura, M., Napoleao, T., Paiva, P., & Coelho, L. (2017). Bacterial biofilms: the structure, development and potential of plant compounds for alternative control. En L. Berhardt (Ed.), *Advances in Medicine and Biology* (págs. 1-34). Nova Science.
- Murray, T. S., & Kazmierczak, B. I. (2008). *Pseudomonas aeruginosa* exhibits sliding motility in the absence of type IV pili and flagella. *Journal of Bacteriology*, 190(8), 2700–2708. doi: 10.1128/JB.01620-07
- Mussi, M. A., Gaddy, J. A., Cabruja, M., Arivett, B. A., Viale, A. M., Rasia, R., & Actis, L. A. (2010). The opportunistic human pathogen *Acinetobacter baumannii* senses and responds to light. *Journal of Bacteriology*, 192(24), 6336–6345. doi:10.1128/JB.00917-10
- Nemec, A., De Baere, T., Tjernberg, I., Vaneechoutte, M., van der Reijden, T. J., & Dijkshoorn, L. (2001). *Acinetobacter ursingii* spp. nov. and *Acinetobacter schindleri* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(5), 1891–1899. doi: 10.1099/00207713-51-5-1891

- Nemec, A., Musílek, M., Maixnerová, M., De Baere, T., van der Reijden, T. J., Vaneechoutte, M., & Dijkshoorn, L. (2009). *Acinetobacter beijerinckii* sp. nov. and *Acinetobacter gyllenbergii* sp. nov., haemolytic organisms isolated from humans. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 59 (1), 118–124. doi: 10.1099/ijs.0.001230-0
- Nemec, A., Musílek, M., Šedo, O., De Baere, T., Maixnerová, M., van der Reijden, T., Zdráhal, Z., Vaneechoutte, M. & Dijkshoorn, L. (2010). *Acinetobacter bereziniae* sp. nov. and *Acinetobacter guillouiae* sp. nov., to accommodate *Acinetobacter* genomic species 10 and 11, respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 60, 896–90. doi: 10.1099/ijs.0.013656-0
- Nucleo, E., Steffanoni, L., Fugazza, G., Migliavacca, R., Giacobone, E., Navarra, A., Pagani, L. & Landini, P. (2009). Growth in glucose based medium and exposure to subinhibitory concentrations of imipenem induce biofilm formation in a multidrug resistant clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *BMC microbiology*,. 9(1): 270. Medline doi:10.1186/1471-2180-9-270
- Ortiz, Y., García-Heredia, A., Merino-Mascorro, A., García, S., Solís-Soto, L., & Heredia, N. (2021). Natural and synthetic antimicrobials reduce adherence of enteroaggregative and enterohemorrhagic *E. coli* to epithelial cells, *PLoS ONE*. 16(5), e0251096. doi: 10.1371/journal.pone.0251096
- Pandey, D., Singhal, N., & Kumar, M. (2021). Investigating the OXA Variants of ESKAPE Pathogens. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 10(12), 1539. doi: 10.3390/antibiotics10121539
- Pedraza, F., Andreu, A., Saune, M., Moreno, A., Ramírez, L. & García, L. (1993). A urinary outbreak of *Acinetobacter baumannii* in a spinal cord injury unit. *Anales de medicina interna (Madrid, Spain : 1984)*, 10 (1): 55-58. doi: 10.1086/502302
- Peleg, A.Y., Seifert, H., Paterson, D.L. (2008). *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. *Clinical microbiology reviews*. 21: 538-582. doi: 10.1128/CMR.00058-07

- Persat, A., Inclan, Y. F., Engel, J. N., Stone, H. A., & Gitai, Z. (2015). Type IV pili mechanochemically regulate virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(24), 7563–7568. doi: 10.1073/pnas.1502025112
- Poirel, L., Naas, T., & Nordmann, P. (2010). Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(1), 24–38. doi:10.1128/AAC.01512-08
- Poulin, M.B. & Kuperman, L.L. (2021). Regulation of Biofilm Exopolysaccharide Production by Cyclic Di-Guanosine Monophosphate. *Frontiers in microbiology*. 12:730980. doi: 10.3389/fmicb.2021.730980
- Prieto Martin Gil, S., Tajuelo, A., López-Siles, M., & McConnell, M. J. (2021). Subinhibitory concentrations of clinically-relevant antimicrobials affect resistance-nodulation-division family promoter activity in *Acinetobacter baumannii*. *Frontiers in Microbiology*, 12, 780201. doi: 10.3389/fmicb.2021.780201
- Rada Cuentas, J. (2016). *Acinetobacter* un patógeno actual. *Revista de la Sociedad Boliviana de Pediatría*, 55(1), 29-48. ISSN 1024-0675
- Ramírez, M. S., Don, M., Merkier, A. K., Bistué, A. J., Zorreguieta, A., Centrón, D., & Tolmasky, M. E. (2010). Naturally competent *Acinetobacter baumannii* clinical isolate as a convenient model for genetic studies. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(4), 1488–1490. doi:10.1128/JCM.01264-09.
- Ranieri, M. R., Whitchurch, C. B., & Burrows, L. L. (2018). Mechanisms of biofilm stimulation by subinhibitory concentrations of antimicrobials. *Current Opinion in Microbiology*, 45 (1), 164–169. doi:10.1016/j.mib.2018.07.006
- Rice, L.B. (2006). Challenges in Identifying New Antimicrobial Agents Effective for Treating Infections with *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*, *Clinical Infectious Diseases*, 43 (2)S100–S105, doi: 10.1086/504487
- Rizos, I., Tsiodras, S., Papathanasiou, S., Rigopoulos, A., Barbetseas, J., & Stefanadis, C. (2007). Prosthetic valve endocarditis due to *Acinetobacter* spp: a rare case and

- literature review. *The American journal of The Medical Sciences*, 333(3), 197–199. doi:10.1097/MAJ.0b013e31803193c4
- Rodríguez, R.D., Bustillo, D.E. Caicedo, D.C., Cadena, D.C. & Castellanos, C. (2016). *Acinetobacter baumannii*: patógeno multirresistente emergente. MéD.UIS. 29(2):113-35 doi: 10.18273/revmed.v29n2-2016010
- Ruimy, R., Brisabois, A., Bernede, C., Skurnik, D., Barnat, S., Arlet, G., Momcilovic, S., Elbaz, S., Moury, F., Vibet, M. A., Courvalin, P., Guillemot, D. & Andremon, A., (2010). Organic and conventional fruits and vegetables contain equivalent counts of Gram-negative bacteria expressing resistance to antibacterial agents. *Environmental microbiology*. 12, 608-61
- Salazar, E.Z. & Nieves, B. (2005). *Acinetobacter* spp: Aspectos microbiológicos, clínicos y epidemiológicos. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 25(2), 64-71. ISSN 1315-2556
- Seifert, H., Dijkshoorn, L., Gerner-Smidt, P., Pelzer, N., Tjernberg, I., & Vaneechoutte, M. (1997). Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(11), 2819–2825. doi: 10.1128/jcm.35.11.2819-2825.1997
- Sheppard, F. R., Keiser, P., Craft, D. W., Gage, F., Robson, M., Brown, T. S., Petersen, K., Sincok, S., Kasper, M., Hawksworth, J., Tadaki, D., Davis, T. A., Stojadinovic, A., & Elster, E. (2010). The majority of US combat casualty soft-tissue wounds are not infected or colonized upon arrival or during treatment at a continental US military medical facility. *American Journal of Surgery*, 200(4), 489–495. doi: 10.1016/j.amjsurg.2010.03.001
- Singh, S., Singh, S. K., Chowdhury, I., & Singh, R. (2017). Understanding the mechanism of bacterial biofilms resistance to antimicrobial agents. *Open Microbiol.*, 11, 53–62. doi:10.2174/1874285801711010053
- Skiebe, E., de Berardinis, V., Morczinek, P., Kerrinnes, T., Faber, F., Lepka, D., Hammer, B., Zimmermann, O., Ziesing, S., Wichelhaus, T. A., Hunfeld, K. P., Borgmann, S., Gröbner, S., Higgins, P. G., Seifert, H., Busse, H. J., Witte, W., Pfeifer, Y., & Wilharm,

- G. (2012). Surface-associated motility, a common trait of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*, depends on 1,3-diaminopropane. *International Journal of Medical Microbiology: IJMM*, 302(3), 117–128. doi: 10.1016/j.ijmm.2012.03.003
- Starakis, I., Blikas, A., Siagris, D., Marangos, M., Karatza, C., & Bassaris, H. (2006). Prosthetic valve endocarditis caused by *Acinetobacter lwoffii*: a case report and review. *Cardiology in Review*, 14(1), 45–49. doi: 10.1097/01.crd.0000163801.67781.a2
- STRING, functional protein association (2022). Date:23/02/2022. Available in: bla-OXA-69 protein (*Acinetobacter baumannii*) - STRING interaction network (string-db.org)
- Subrt, N., Mesak, L.R. & Davies, J. (2011). Modulation of virulence gene expression by cell wall active antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 66(5): 979-984. doi:10.1093/jac/dkr043
- Sugano, M., Morisaki, H., Negishi, Y., Endo-Takahashi, Y., Kuwata, H., Miyazaki, T., & Yamamoto, M. (2016). Potential effect of cationic liposomes on interactions with oral bacterial cells and biofilms. *Journal of Liposome Research*, 26(2), 156–162. doi:10.3109/08982104.2015.1063648
- Tavakol, M., Momtaz, H., Mohajeri, P., Shokoohizadeh, L., & Tajbakhsh, E. (2018). Genotyping and distribution of putative virulence factors and antibiotic resistance genes of *Acinetobacter baumannii* strains isolated from raw meat. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 7, 120. doi:10.1186/s13756-018-0405-2
- Tomaras, A. P., Dorsey, C. W., Edelmann, R. E., & Actis, L. A. (2003). Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology*, 149(Pt 12), 3473–3484. doi: 10.1099/mic.0.26541-0
- Tomaras, A. P., Flagler, M. J., Dorsey, C. W., Gaddy, J. A., & Actis, L. A. (2008). Characterization of a two-component regulatory system from *Acinetobacter baumannii* that controls biofilm formation and cellular morphology. *Microbiology*, 154(Pt 11), 3398–3409. doi:10.1099/mic.0.2008/019471-0

- Tsen, S.D., Fang, F., Chen, M., Chien, M., Lee, C. and Tsen, D.H. (2002). Natural plasmid transformation in *E. coli*. *Biomedical Science* 9(3) 246-252 doi:10.1007/BF02256071
- Vanegas-Múnera, J.M., Roncancio-Villamil, G., & Jiménez-Quiceno, J.N. (2014). *Acinetobacter baumannii*: importancia clínica, mecanismos de resistencia y diagnóstico. *CES Medicina*, 28(2), 233-246.
- Vaz-Moreira, I., Novo, A., Hantsis-Zacharov, E., Lopes, A.R., Gomila, M., Nunes, O.C., Manaia, C.M., & Halpern, M. (2011). *Acinetobacter rudis* sp. nov., isolated from raw milk and raw wastewater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 61, 2837–284. doi. 10.1099/ijls.0.027045-0
- Whitfield, C., Wear, S. S., & Sande, C. (2020). Assembly of Bacterial Capsular Polysaccharides and Exopolysaccharides. *Annual Review of Microbiology*, 74, 521–543. doi:10.1146/annurev-micro-011420-075607
- Wisplinghoff, H., Bischoff, T., Tallent, S. M., Seifert, H., Wenzel, R. P., & Edmond, M. B. (2004). Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clinical Infectious Diseases: an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 39(3), 309–317. doi:10.1086/421946
- Wong, D., Nielsen, T. B., Bonomo, R. A., Pantapalangkoor, P., Luna, B., & Spellberg, B. (2017). Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter* infections: a century of challenges. *Clinical Microbiology Reviews*, 30(1), 409–447. doi: 10.1128/CMR.00058-16
- Yang, C.H., Su, P.W., Moi, S. H., & Chuang, L. Y. (2019). Biofilm Formation in *Acinetobacter Baumannii*: Genotype-Phenotype Correlation. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(10), 1849. doi: 10.3390/molecules24101849
- Yan, J., & Bassler, B. L. (2019). Surviving as a community: antibiotic tolerance and persistence in bacterial biofilms. *Cell Host Microbe* 26, 15–21. doi: 10.1016/j.chom.2019.06.002

Young, L., Sabel, A., Price, C. (2007). Epidemiologic, clinical, and economic evaluation of an outbreak of clonal multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection in a surgical intensive care unit. *Infection control and hospital epidemiology*. 28:1247-54. doi:10.1086/521660

Zarrilli, R., Bagattini, M., Migliaccio, A., Esposito, E. P., & Triassi, M. (2021). Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Italy. *Annali di Igiene: Medicina Preventiva e di Comunità*, 33(5), 401–409. doi: 10.7416/ai.2020.2395