



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**ANÁLISIS GENÓMICO Y FUNCIONAL DEL INFECTOMA DE UNA CEPA
MULTIRRESISTENTE de *Acinetobacter baumannii*, AISLADA DE UN HOSPITAL DE
BOGOTÁ-COLOMBIA**

DIANA CAROLINA QUINTERO ARÉVALO

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
POSGRADO INTERFACULTADES MICROBIOLOGÍA
BOGOTÁ-COLOMBIA**

2014

**ANÁLISIS GENÓMICO Y FUNCIONAL DEL INFECTOMA DE UNA CEPA
MULTIRRESISTENTE de *Acinetobacter baumannii*, AISLADA DE UN HOSPITAL DE
BOGOTÁ-COLOMBIA**

DIANA CAROLINA QUINTERO ARÉVALO

**Trabajo de Tesis presentado como requisito para optar al título de
Magister en Ciencias- Microbiología**

**DIRIGIDO POR:
MARIA TERESA REGUERO REZA M.Sc.**

Línea de Investigación:

Grupo Interdisciplinario de Epidemiología Molecular de la infección intrahospitalaria

Grupos de Investigación:

**Grupo de Epidemiología Molecular de las Enfermedades Asociadas al Cuidado de la Salud y
grupo Bionformática**

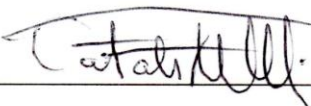
**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
POSGRADO INTERFACULTADES MICROBIOLOGÍA
BOGOTÁ-COLOMBIA**

2014

NOTA DE ACEPTACIÓN

La presente tesis "ANÁLISIS GENÓMICO Y FUNCIONAL DEL INFECTOMA DE UNA CEPA MULTIRRESISTENTE de *Acinetobacter baumannii*, AISLADA DE UN HOSPITAL DE BOGOTÁ-COLOMBIA", fue sustentada y aprobada para el grado de Maestría en Microbiología, el 21 de abril de 2014

En constancia firman:



Jurado: Catalina Arévalo Ferro
Departamento de Biología
Facultad de Ciencias
Universidad Nacional de Colombia



Jurado Aura Lucia Leal
Facultad de Medicina
Universidad Nacional de Colombia



Director de Tesis: Ma. Teresa Reguero Reza
Instituto de Biotecnología
Universidad Nacional de Colombia.

Agradecimientos

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos a mi mamá por ser la persona que siempre me ha apoyado, ha confiado en mí y ha estado conmigo acompañándome y colaborándome en cada uno de los éxitos que he tenido en mi vida. Le doy gracias también por ser mi ejemplo a seguir, por haberme enseñado los valores para ser la persona que soy ahora, por ser la fuerza para levantarme cada mañana y seguir adelante, solo espero poderle contribuir cada una de las cosas que ella me ha brindado, mamá de corazón te amo.

También agradezco a las docentes Emilia Valenzuela y María Teresa Reguero por su colaboración constante y paciencia durante el proceso del desarrollo de este trabajo.

A los grupos de Epidemiología Molecular de la infección intrahospitalaria dirigido por el profesor José Ramón Mantilla y de Bioinformática dirigido por el profesor Emiliano Barreto, de la Universidad Nacional de Colombia por su colaboración en este proceso. De manera muy especial agradezco al profesor José Ramón Mantilla por haber sido la primera persona en brindarme su apoyo y haber confiado en mi trabajo para pertenecer a su grupo de investigación.

A todos los docentes que conocí durante la maestría por enseñarme y contribuir en mi formación académica y personal.

A Alexandra Cepeda y Natalia Comba por brindarme su amistad, conocimiento, experiencia y colaboración en el desarrollo y estandarización del objetivo asociado con proteómica que se realizó en esta tesis, su ayuda fue indispensable para lograr cumplir este objetivo.

A mi novio Fredy Alexander, por su apoyo incondicional, por ser la persona que me impulsó para continuar con mi formación académica, por sus consejos, por su amor, comprensión y por ser un ejemplo a seguir en mi vida, mil gracias.

A mis compañeras y amigas Vanessa, Tatiana, Laura, Lili y Astrid por brindarme una amistad sincera y compartir conmigo esta experiencia académica.

A la Universidad Nacional de Colombia por haberme permitido ser una integrante de esta Institución y brindarme las herramientas y espacios para culminar la tesis.

Al posgrado interfacultades de Microbiología por contribuir en mi formación académica.

A la profesora Martha Fontanilla, por ser tan humana y comprensiva, por sus excelentes clases. A Socorro Prieto por su paciencia y colaboración.

A Colciencias por su apoyo económico en el desarrollo de la investigación

A todas las personas que de alguna manera de corazón han estado conmigo mil gracias.

Resumen

La especie de *Acinetobacter baumannii* se ha convertido en un patógeno oportunista difícil de tratar a nivel clínico, debido a la resistencia que ha adquirido a varios tipos de antibióticos y a la presencia de factores de virulencia que le permiten causar infecciones nosocomiales, especialmente en pacientes que se encuentran en unidades de cuidados intensivos.

Esta investigación se centró en la identificación de genes codificantes de factores asociados a la virulencia, en el genoma de la cepa *A. baumannii* 107m multirresistente, aislada de un hospital de Bogotá, que se encuentra conservada en el cepario del Instituto de Biotecnología (IBUN) de la Universidad Nacional de Colombia y en el estudio de proteínas de membrana externa, asociadas con los factores de virulencia de esta bacteria.

Para cumplir con estos objetivos, se realizó el aislamiento del ADN, secuenciación de alto rendimiento por Illumina (HiSeq 2000) finales pareados y pirosecuenciación 454 *mate pair*; ensamblaje del genoma con la herramienta BWA 0.6.1 y *de Novo* como Velvet 1.2.07 y Newbler 2.7 (©Roche Diagnostics Corporation). La anotación del genoma se realizó utilizando NCBI's Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAAP) y la verificación manual en el Centro de Bioinformática del IBUN. Con el propósito de evidenciar la expresión de algunos genes, asociados a virulencia, presentes en membrana externa, se procedió al aislamiento de las proteínas de membrana y su análisis por electroforesis bidimensional. Se seleccionaron algunos "spots" que presentaban expresión diferencial comparada con *A. baumannii* ATCC 19606, los cuales fueron identificados por espectrometría de masas (MALDI TOF-TOF).

Los resultados obtenidos del estudio genómico llevaron a la identificación de 113 genes, dentro de los cuales se destacan grupos de genes que codifican para proteínas que contribuyen en la adhesión (*csu*, *pap* y *pil*); a la biosíntesis de sideróforos (*bas*, *bau*, *bar*) y a la invasión (*Omp38*, *plc*). Los resultados proteómicos permitieron la identificación de proteínas de membrana externa asociadas a la virulencia, dentro de las que se destacan

receptores de hierro (*TonB*); una proteína asociada a apoptosis celular (*Omp38*) y proteínas (*OmpW*) implicadas en la defensa de la bacteria. Los resultados genómicos y proteómicos llevan a concluir que la cepa *A. baumannii* 107m multirresistente contiene algunos genes que hacen que se considere una bacteria virulenta. Sin embargo, se requieren más estudios experimentales que comprueben la patogenicidad de esta bacteria.

Palabras clave: *Acinetobacter baumannii*, patogenicidad, factores de virulencia, infectoma

Abstract

Acinetobacter baumannii has become an opportunistic pathogen difficult for clinical treatment, because it has acquired resistance to diverse antibiotic groups. The presence of virulence factors in this microorganism has contributed to the rise of nosocomial infections, especially affecting patients in intensive care units. This research was focused on two aspects: first, in the identification of genes encoding factors associated with virulence in the genome of the multidrug-resistant strain *A. baumannii* 107m isolated from a hospital in Bogota, which is preserved in the culture collection of the Biotechnology Institute (IBUN) of the Nacional University of Colombia. Second aspect was the study of outer membrane proteins associated with virulence of this bacteria. To accomplish both objectives, we performed DNA isolation, high-throughput sequencing by Illumina (HiSeq2000) and 454 mate pair; genome assembly with mapping tools such as BWA 0.6.1 and de novo assembly with Velvet 1.2.07, and Newbler 2.7 (©Roche Diagnostics Corporation). Annotation was performed using NCBI Prokaryotic Genome Automatic Anotation Pipeline (PGAAP) and manual verification was done at Bioinformatics Center of IBUN. In order to assess the expression of some genes coding for outer membrane proteins that might be involved in virulence, we proceeded to the isolation of membrane proteins and their analysis by two-dimensional electrophoresis. We selected some spots with differential expression compared to that of *A. baumannii* ATCC 19606, which were identified by mass spectrometry (MALDI TOF-TOF). The genomic study results led to the identification of 113 genes, that encode proteins involved in adherence (*csu*, *pap* and *pil*) biosynthesis of siderophores (*bas*, *bau*, *bar*) and invasion (*Omp38*, *plc*). Proteomic results allowed the identification of outer membrane proteins associated with iron receptors (*TonB*), a protein associated with cell apoptosis (*Omp38*) and proteins involved in defense (*OmpW*). Relations between genomic and proteomic results derived from this study, suggest that the multidrug-resistant *A. baumannii* 107m has genes involved in virulence. However, more experimental studies are required to verify the *A. baumannii* 107m pathogenicity.

Key Words: *A. baumannii*, pathogenicity, virulence factors, infectome

Contenido

| Resumen | Pág |
|--|-----------|
| Lista de figuras | |
| Lista de tablas | |
| Introducción..... | 1 |
| 1. Capítulo 1: MARCO TEÓRICO | 3 |
| 1.1 Generalidades de <i>Acinetobacter baumannii</i> | 3 |
| 1.2 Infectoma..... | 4 |
| 1.3 Patogenicidad y virulencia..... | 4 |
| 1.4 Proceso de infección de las bacterias patógenas..... | 5 |
| 1.4.1 Adherencia..... | 5 |
| 1.4.2 Colonización..... | 6 |
| 1.4.3 Invasión..... | 6 |
| 1.5 Factores de virulencia..... | 6 |
| 1.6 Factores de virulencia en <i>Acinetobacter baumannii</i> | 7 |
| 1.6.1 Factores de adherencia..... | 7 |
| 1.6.1.1 Pilis..... | 7 |
| 1.6.1.2 Superficie hidrofóbica..... | 10 |
| 1.6.2 Factores de colonización..... | 10 |
| 1.6.2.1 Sideróforos..... | 11 |
| 1.6.3 Factores de invasión..... | 13 |
| 1.6.3.1 Fosfolipasas..... | 13 |
| 1.6.3.2 Cápsula..... | 14 |
| 1.6.3.3 Proteínas de membrana externa (OMPs)..... | 15 |
| 2. Capítulo 2: Objetivos..... | 18 |
| 2.1 General..... | 18 |
| 2.2 Específicos..... | 18 |
| 3. Capítulo 3: Metodología..... | 19 |
| 3.1 Obtención del ADN total de <i>A. baumannii 107m</i> | 19 |
| 3.1.1 Cultivo de la bacteria..... | 19 |
| 3.1.2 Aislamiento del ADN..... | 20 |
| 3.1.3 Obtención del ADN..... | 20 |
| 3.1.4 Purificación del ADN..... | 20 |
| 3.1.5 Concentración ADN..... | 20 |
| 3.1.6 Cuantificación del ADN..... | 21 |
| 3.2 Anotación..... | 21 |

| | |
|---|-----------|
| 3.3 Obtención de la fracción de proteínas de membrana externa de la cepa <i>A. baumannii</i> 107m y de la cepa de <i>A. baumannii</i> ATCC 19606..... | 23 |
| 3.3.1 Extracción proteínas de membrana externa (Molloy <i>et al.</i> , 2000)..... | 23 |
| 3.3.2 Cuantificación de las proteínas de membrana externa..... | 24 |
| 3.3.3 Electroforesis bidimensional..... | 25 |
| 3.3.3.1 Primera dimensión: isoelectroenfoque..... | 25 |
| 3.3.3.2 Segunda dimensión: separación por tamaño..... | 26 |
| 3.3.4 Análisis de los geles bidimensionales..... | 26 |
| 3.3.5 Espectrometría de masas..... | 27 |
| 3.4 Comparación de los genes asociados a virulencia en la cepa <i>A. baumannii</i> 107m con los reportados en la base de datos | 28 |
| 4. Capítulo 4: Resultados..... | 30 |
| 4.1 Genes codificantes de sistemas de adherencia y motilidad..... | 30 |
| 4.2 Genes codificantes involucrados en la biosíntesis de Sideróforos..... | 34 |
| 4.3 Genes codificantes para cápsula positiva..... | 39 |
| 4.4 Genes codificantes de fosfolipasas..... | 40 |
| 4.5 Otros genes codificantes de proteínas de membrana externa asociados a virulencia en <i>A. baumannii</i> 107m..... | 41 |
| 4.6 Análisis de las proteínas diferencialmente expresadas en los geles bidimensionales..... | 43 |
| 4.7 Análisis por espectrometría de masas, de las proteínas diferencialmente expresadas (expresada con mayor intensidad)..... | 44 |
| 4.8 Genes codificantes de sistemas de adherencia y motilidad..... | 49 |
| 4.9 Genes codificantes de proteínas encargadas de la biosíntesis, transporte y liberación de sideróforos..... | 53 |
| 4.10 Genes codificantes de receptores de hierro..... | 56 |
| 4.11 Genes codificantes para cápsula positiva..... | 56 |
| 4.12 Genes codificantes de fosfolipasas..... | 59 |
| 4.13 Genes codificantes de proteínas de membrana externa asociadas a virulencia | 59 |
| 5. Capítulo 5: Análisis y discusión de resultados | 68 |
| 5.1 Genes codificantes de sistemas de adherencia y motilidad..... | 68 |
| 5.2 Genes codificantes encargados de la biosíntesis de Sideróforos..... | 72 |
| 5.3 Genes codificantes para cápsula, fosfolipasas y proteínas de membrana externa asociadas a virulencia..... | 75 |
| 5.4 Receptores <i>TonB</i> | 77 |
| 5.5 <i>OmpW</i> | 79 |
| 5.6 Comparación de genes codificantes de pili tipo I y IV..... | 84 |
| 5.7 Comparación de genes codificantes de sideróforos..... | 85 |
| 5.8 Comparación de genes codificantes de proteínas de membrana externa y de genes codificantes para el ensamblaje y polimerización de la cápsula..... | 86 |
| 6. Capítulo 6: Conclusiones y recomendaciones..... | 88 |
| 6.1 Conclusiones..... | 88 |
| 6.2 Recomendaciones..... | 89 |

Bibliografía

Lista de figuras

Figura 1: Mapa genético y físico del locus *csu* de *A. baumannii* 19606

Figura 2: Organización genética del cluster acinetobactin en *A. baumannii* ATCC 19606

Figura 3: Electroforesis bidimensional de proteínas de membrana externa de *A. baumannii* 107m y *A. baumannii* ATCC 19606

Figura 4: *Spots* identificados en la electroforesis bidimensional de proteínas de membrana externa de *A. baumannii* 107m y *A. baumannii* ATCC 19606

Figura 5: Proteína de membrana externa que presentó el mismo nivel de expresión en las dos cepas de estudio

Figura 6: Sintenia de los genes codificantes del sistema de pili tipo I (operón *pap*) entre cepas de *A. baumannii*

Figura 7: Sintenia de los genes codificantes del sistema de pili tipo I (operón *csu*) entre cepas de *A. baumannii*

Figura 8: Sintenia de los genes codificantes del sistema de pili tipo IV entre cepas de *A. baumannii*

Figura 9: Comparación de la ubicación de los genes que hacen parte de los sistema de pili tipo I y IV entre las cepas de *A. baumannii* 107m, *A. baumannii* ACICU, *A. baumannii* AB0057, *A. baumannii* ATCC 17978 y *A. baumannii* ATCC 19606

Figura 10: Sintenia de los genes codificantes del sideróforo acinetobactin entre cepas de *A. baumannii*

Figura 11: Sintenia de los genes codificantes que contienen el gen *entA* necesario para la completa biosíntesis del sideróforo acinetobactin entre especies de *A. baumannii*

Figura 12: Sintenia de los genes putativos codificantes del sideróforo putativo entre especies de *A. baumannii*

Figura 13: Comparación de la ubicación de los genes necesarios para la biosíntesis y transporte de sideróforos entre las cepas de *A. baumannii* 107m, *A. baumannii* ACICU, *A. baumannii* AB0057, *A. baumannii* ATCC 17978 y *A. baumannii* ATCC 19606

Figura 14: Sintenia de los genes codificantes del ensamblaje y polimerización de la cápsula entre cepas de *A. baumannii*.

Figura 15: Comparación de la ubicación de los genes necesarios para el ensamblaje y polimerización entre las cepas de *A. baumannii* 107m, *A. baumannii* ACICU, *A. baumannii* AB0057, *A. baumannii* ATCC 17978 y *A. baumannii* ATCC 19606

Figura 16: Sintenia de los genes codificantes que contienen el gen *Omp38* entre cepas de *A. baumannii*.

Figura 17: Comparación de la ubicación de los genes que contiene el gen *OmpA* entre las cepas de *A. baumannii* 107m, *A. baumannii* ACICU, *A. baumannii* AB0057, *A. baumannii* ATCC 17978 y *A. baumannii* ATCC 19606

Figura 18: Alineamiento de secuencias del gen *pilA* de las cepas de *A. baumannii* 107m, *A. baumannii* ACICU, *A. baumannii* AB0057, *A. baumannii* ATCC 17978 y *A. baumannii* ATCC 19606

Figura 19: Mapa de sintenia del grupo de genes codificantes de sistema de pili tipo IV

Figura 20: Mapa de sintenia del grupo de genes codificantes del sistema de pili tipo I

Figura 21: Mapa de sintenia del grupo de genes putativos codificantes del sideróforo putativo y del grupo de genes codificantes de proteínas encargadas de la biosíntesis del sideróforo acinetobactin

Figura 22. Mapa de sintenia del grupo de genes codificantes de cápsula

Figura 23: Mapa de sintenia del grupo de genes situados alrededor del gen *Omp38*

Figura 24: Grupo de genes que conforman el sistema de pili tipo IV en *A. baumannii* 107m.

Figura 25: Grupo de genes que conforman el sistema de pili tipo I en *A. baumannii* 107m (operón *pap* y operón *csu*)

Figura 26: Organización del grupo de genes que contribuyen en la biosíntesis del sideróforo acinetobactin en el genoma de *A. baumannii* 107m.

Figura 27: Organización genética del grupo de genes que contienen el gen *entA* en el genoma de *A. baumannii* 107m.

Figura 28: Organización del grupo de genes putativos que conforman el sideróforo putativo en el genoma de *A. baumannii* 107m.

Figura 29: Organización de genes que contribuyen en la polimerización y ensamblaje de la cápsula en *A. baumannii* 107m.

Lista de tablas

Tabla 1: Factores de virulencia más relevantes en la infección *in-vivo*

Tabla 2: Grupo de genes codificantes del sistema pili tipo IV *A. baumannii* 107m.

Tabla 3: Genes codificantes del sistema de pili tipo I (operón *pap*) en *A. baumannii* 107m

Tabla 4: Genes codificantes del sistema de pili tipo I (operón *csu*) en *A. baumannii* 107m

Tabla 5: Gen codificante del sistema de pili tipo III en *A. baumannii* 107m

Tabla 6: Gen codificante de *N-acil-L-homoserin lactona sintetasa (Abal)*

Tabla 7: Genes codificantes del sideróforo acinetobactin en la cepa *A. baumannii* 107m

Tabla 8: Grupo de genes que contienen el gen *entA* necesario para la completa biosíntesis del sideróforo acinetobactin en la cepa *A. baumannii* 107m

Tabla 9: Grupo de genes codificantes de un sideróforo putativo en *A. baumannii* 107m

Tabla 10: Genes codificantes de receptores de sideróforos en *A. baumannii*

Tabla 11: Genes codificantes de polimerización y ensamblaje de cápsula en *A. baumannii* 107m

Tabla 12: Genes codificantes proteínas con actividad enzimática en *A. baumannii* 107m

Tabla 13: Genes codificantes de proteínas de membrana externa en *A. baumannii* 107m

Tabla 14: Lista de genes codificantes de proteínas asociadas a factores de virulencia en la cepa *A. baumannii* 107m

Tabla 15: Información de las proteínas identificadas por espectrometría de masas, mediante MALDI TOF-TOF

Tabla 16: Características de las cepas de estudio

Tabla 17: Tamaño del gen *pilA* encontrado en las cepas de *A. baumannii* 107m, *A. baumannii* ACICU, *A. baumannii* AB0057, *A. baumannii* ATCC 17978 y *A. baumannii* ATCC 19606

Tabla 18: Tamaño del gen *OmpA* encontrado en las cepas de *A. baumannii* 107m, *A. baumannii* ACICU, *A. baumannii* AB0057, *A. baumannii* ATCC 17978 y *A. baumannii* ATCC 19606

Lista de anexos

ANEXO A: Multirresistencia de *A. baumannii* 107m

ANEXO B: Obtención del ADN a partir del lisado

ANEXO C: Purificación del ADN en columnas de Qiagen®

ANEXO D: Cuantificación del ADN por Qubit®

ANEXO E: Genes asociados a virulencia reportados con más frecuencia en *A. baumannii*

ANEXO F: Espectros de masas correspondientes a las proteínas identificadas en *Acinetobacter baumannii* 107m y ATCC 19606

ANEXO G: Lista de IDs de los genes codificantes asociadas con factores de virulencia de la cepa en estudio *A. baumannii* 107m y las cepas ACICU, AB0057, ATCC 19606 y ATCC17978

Introducción

El género *Acinetobacter*, en especial la especie *baumannii*, ha adquirido importancia clínica en los últimos 15 años, debido a la capacidad que tiene de adquirir determinantes de resistencia, convirtiéndose en un patógeno oportunista con alta incidencia infecciosa en las instituciones de salud. (Peleg *et al.*, 2008; Russo *et al.*, 2010; Jacobs *et al.*, 2010; Doughary *et al.*, 2011).

A. baumannii tiene la capacidad de crecer dentro de un amplio rango de temperatura (28 - 44°C), en condiciones húmedas o secas, es resistente a la desecación, desinfectantes y resistente a varios grupos de antibióticos, características que hacen que sea un patógeno que se adapta fácilmente al entorno hospitalario. Además, esta especie puede formar biofilm en superficies abióticas lo que le permite fácilmente colonizar y sobrevivir en estos lugares durante largos períodos de tiempo. (Gaddy *et al.*, 2009; Jacobs *et al.*, 2010).

A pesar del incremento mundial en la incidencia de infecciones producidas por *A. baumannii*, queda mucho por elucidar sobre los elementos que contribuyen en el proceso infeccioso (factores de virulencia) (Peleg *et al.*, 2008; Gordon & Wareham, 2010). Sin embargo, la disponibilidad actual de genomas completamente secuenciados de esta especie, han demostrado que *A. baumannii* alberga un considerable número de genes putativos asociados a la virulencia (Smith *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 2011).

El rápido avance en la secuenciación de genomas completos (den Bakker *et al.*, 2010) ha sido fundamental para comprender el comportamiento de un gran número de especies y cepas bacterianas, incluyendo una considerable cantidad de bacterias patógenas. Por otro lado, las tecnologías proteómicas también han sido ampliamente utilizadas para investigar expresión de los genes y la fisiología en microorganismos. La proteómica integra un conjunto de metodologías precisas y eficaces como herramientas para llevar a cabo análisis de proteínas a gran escala. A través de la cuantificación de las proteínas es posible evidenciar la expresión génica así como caracterizar procesos biológicos asociados a factores de virulencia, que la bacteria puede expresar en una infección. (Anderson & Anderson, 1998).

El grupo de Epidemiología Molecular de las Enfermedades Asociadas al Cuidado de la Salud y el grupo Bionformática del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia desde el año de 1990, ha venido realizando investigaciones en aislamientos de bacterias Gram negativas, entre ellas *A. baumannii*, causantes de infecciones asociadas al cuidado de la salud sobre las bases moleculares de la resistencia. En el año 2002, el grupo investigó sobre las bacterias productoras de beta-lactamasas de espectro extendido en centros hospitalarios en Bogotá, en el año 2005 sobre las enterobacteriaceae productoras de cefotaximasas (CTX-M). Entre los años 2006 y 2009 trabajó con 128 aislamientos de *Acinetobacter sp.* asociados con brotes epidémicos provenientes de 4 hospitales de Bogotá de tercer nivel, con el fin de identificarlos a través del sistema automatizado VITEK (BioMerieux S.A, France) y por métodos moleculares, ITS y rpoB.

De los 128 aislamientos caracterizados, durante los años 2011 -2013, los grupos de Epidemiología Molecular de las Enfermedades Asociadas al Cuidado de la Salud y el de Bionformática seleccionaron tres de ellas con base en sus características biológicas, que hacen parte del complejo *Acinetobacter calcoaceticus baumannii* (*Acinetobacter pittii*, *Acinetobacter nosocomialis* y *Acinetobacter baumannii* 107m) y realizaron una investigación a través del proyecto “Genómica comparativa y funcional del resistoma y del infectoma de genomoespecies del complejo *Acinetobacter calcoaceticus baumannii*, causantes de infecciones asociadas al cuidado de la salud en Colombia”, financiado por Colciencias.

La presente investigación partió del proyecto mencionado anteriormente y se centró en la cepa *Acinetobacter baumannii* 107m mediante un estudio genómico encaminado a identificar genes codificantes de factores de virulencia por métodos bioinformáticos y en el estudio de proteínas de membrana externa asociadas con los factores de virulencia. Los resultados obtenidos, permitieron tener una mejor comprensión del comportamiento patógeno de esta cepa y proporcionaron información relevante hasta ahora no reportada en Colombia.

1. Capítulo 1: MARCO TEÓRICO

1.1 Generalidades de *Acinetobacter baumannii*

A. baumannii, es un cocobacilo que pertenece a la familia Moraxellaceae, en años recientes ha ganado notoriedad como patógeno nosocomial. (Gould, 2008). *A. baumannii* es una bacteria Gram-negativa, estrictamente aeróbica, no fermentadora, inmóvil, catalasa positiva, oxidasa-negativa con un contenido de GC del 39 al 40%. (Prashanth & Badrinath, 2005)

A. baumannii, se caracteriza por su resistencia a los antibióticos utilizados en el tratamiento clínico de infecciones. La mayoría de las cepas de *A. baumannii* son resistentes a los aminoglicósidos, tetraciclinas, cefalosporinas, β -lactámicos, cefotaximas, cloranfenicol, gentamicina y tobramicina (Prashanth & Badrinath, 2005). También se ha informado resistencia a carbapenémicos por la aparición de enzimas y mecanismos de resistencia asociados con la membrana (Peleg *et al.*, 2008).

Este microorganismo ha sido considerado un patógeno oportunista (Mortensen & Skaar, 2012) y se ha asociado con una amplia gama de infecciones (piel, sangre, tejidos blandos, tracto respiratorio e infecciones sanguíneas asociadas a prótesis) constituyéndose en un problema particular en unidades de cuidados intensivos (UCIs) donde los brotes son numerosos y muy difíciles de controlar. (Gordon & Wareham, 2010). Algunas cepas de *A. baumannii* son causantes de bacteremias, neumonías, meningitis, e infecciones del tracto urinario, heridas e infecciones sanguíneas.

A pesar de que *A. baumannii* es una de las especies clínicamente más importante, existen otras especies como *A. nosocomialis* y *A. pittii*, las cuales son fenotípica y genotípicamente similares a *A. baumannii* y además han sido causantes de infecciones asociadas al cuidado de la salud. (Di Nocera *et al.*, 2011).

1.2 Infectoma

Para comprender holísticamente las enfermedades infecciosas es necesario considerar las interacciones patógeno-hospedero. Para ello se han empleado diferentes estrategias investigativas, dentro de las cuales se destaca la infectómica, definida por Huang y cols. (2001) como "la genómica y proteómica estructural y funcional de las enfermedades infecciosas".

En los estudios sobre el infectoma se abordan las características genómicas de los patógenos, en los cuales los procesos evolutivos han sido clave en el desarrollo de la patogénesis microbiana, ya que la adquisición de genes, delección, inserción y mutación puntual, son los mayores eventos que han conducido a la emergencia y evolución de patógenos microbianos (Sokurenko *et al.*, 1998)

Además, en la adquisición de genes de virulencia de cepas que han evolucionado a cepas patógenas, están implicadas las denominadas islas de patogenicidad (PAIs), las cuales son generalmente grandes regiones cromosomales, aproximadamente entre 50 - 200 kb, que están flanqueadas por secuencias repetidas o secuencias de inserción (IS) y contienen usualmente diferentes contenidos de GC, comparados con el resto del cromosoma. (Ochman & Moran, 2001).

Se aclara que en este trabajo se estudiará el infectoma solamente de la bacteria de *Acinetobacter buamnii* 107m

1.3 Patogenicidad y virulencia

En 1996 Barón define la patogenicidad como la capacidad que tiene el microorganismo para causar enfermedad y Falkow (1997) define, un patógeno como "cualquier microorganismo cuya supervivencia depende de su capacidad para replicarse y persistir en otra especie". La supervivencia de las bacterias patógenas en un hospedero, requiere de factores que promuevan su adhesión, colonización e invasión y que causen daño. (Lipsitch & Moxon, 1997).

La colonización o infección en los pacientes por cepas de *A. baumannii* multirresistente, depende de los factores tanto del hospedero como de la bacteria, dentro de las que se incluyen: factores dependientes del hospedero (quemaduras, inmunodeficiencias) y factores externos (ingreso en un servicio hospitalario donde *A. baumannii* sea endémico, tiempo prolongado en el hospital en UCI, contacto a dispositivos médicos contaminados, como ventilación mecánica, uso de dispositivos intravasculares y, finalmente, tratamientos antimicrobianos previos). (Lee *et al.*, 2004; Playford *et al.*, 2007).

La virulencia, se define como la medida de la patogenicidad de un organismo y puede verse afectada por numerosas variables, tales como el número de bacterias que infectan, la vía de entrada en el cuerpo, los mecanismos específicos y no específicos de defensa y los factores de virulencia de la bacteria (Baron, 1996). La virulencia está medida en términos de mortalidad (porcentaje de individuos de una población que mueren ante una determinada infección) y de morbilidad (porcentaje de individuos de una población que desarrollan la enfermedad). (Aranda, 2008).

1.4 Proceso de infección de las bacterias patógenas

En general el proceso infeccioso para la mayoría de las bacterias patógenas requiere de las siguientes etapas:

1.4.1 Adherencia

Es la primera etapa utilizada por la bacteria para fijarse a los tejidos del huésped. (De la Rosa *et al.*, 2011). La adherencia requiere de unas estructuras sobre la superficie de la célula bacteriana llamadas adhesinas, y de unos receptores complementarios sobre las superficies de la célula del hospedero. Estas adhesinas de la bacteria incluyen adhesinas fimbriales y no fimbriales, polisacárido capsular o componentes de la pared celular. (Bergogne-Berézín *et al.*, 2012)

1.4.2 Colonización

Después de que la bacteria se ha adherido a un tejido debe multiplicarse en los espacios intercelulares y crecer en la superficie de los tejidos, este proceso se define como colonización (De la Rosa *et al.*, 2011).

1.4.3 Invasión

Para iniciar un proceso infeccioso, la bacteria debe ser capaz de invadir los tejidos. Cuando el microorganismo invade un tejido corporal, las primeras células que debe enfrentar son los fagocitos del huésped. Si los fagocitos pueden destruir al microorganismo, no habrá daño ulterior del huésped, pero si el patógeno supera las defensas del huésped, puede causar daño en las células del huésped de 3 formas básicas: 1) utilizando los nutrientes del huésped 2) causando daño directo en la cercanía inmediata de la invasión 3) produciendo toxinas transportadas por la sangre y la linfa. (Tortora *et al.*, 2007)

1.5 Factores de virulencia

Los factores de virulencia son productos de la expresión de los genes que le dan a la bacteria la capacidad de persistir e invadir una gran cantidad de especies y causar enfermedad. Estos factores comprenden en general las toxinas (endo y exotoxinas), apéndices como pilis, fimbrias, flagelos, cápsula, componentes de la superficie de la célula (adhesinas fimbriales y no fimbriales), sideróforos, variación de los antígenos de superficie y enzimas hidrolíticas como las proteasas y otras que pueden contribuir a la patogenicidad de la bacteria (Vallenet *et al.*, 2008).

Las bacterias patógenas Gram negativas (GNB) requieren múltiples factores de virulencia para causar infecciones. La posesión de genes de virulencia facilita a los patógenos infectar al hospedero eficientemente. (Russo *et al.*, 2010)

Los factores de virulencia no deben ser considerados independientes de las defensas del hospedero. El curso clínico de la enfermedad a menudo depende de la interacción de factores de virulencia con la respuesta inmunológica del hospedero (Moxon & Tang,

2000). Por otro lado, es importante tener presente que los factores de virulencia pueden estar presentes tanto en cepas virulentas como avirulentas, pero es posible que sólo sean funcionales en las cepas virulentas (Aranda, 2008)

De acuerdo con Falkow (1988) y Moxon & Tang (2000), los factores de virulencia más relevantes en la infección *in-vivo* y su función se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 1: Factores de virulencia más relevantes en la infección *in-vivo*.

Tomado de: Moxon & Tang, 2000.

| TIPO FACTORES | RAZONES |
|------------------|--|
| Adhesinas | Tropismo por los tejidos del hospedero. |
| Invasinas | Invasión de los tejidos del hospedero. |
| Evasinas | Facilitan la sobrevivencia del microorganismo. |
| Pubulinas | Estrategias para adquirir nutrientes y cofactores. |
| Toxinas | Dañan directamente los tejidos del hospedero. |

1.6 Factores de virulencia en *Acinetobacter baumannii*

Los factores de virulencia que *A. baumannii* utiliza para llegar a causar un proceso infeccioso son:

1.6.1 Factores de adherencia

1.6.1.1 Pilis

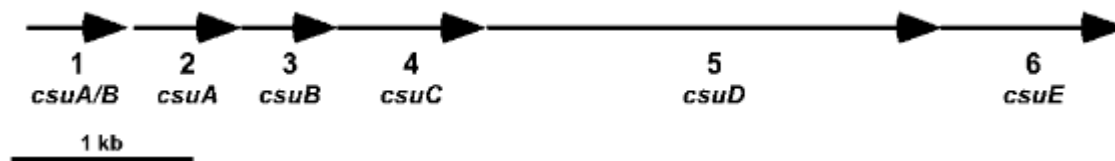
Los pilis y las fimbrias representan un importante factor para que la bacteria pueda adherirse a las superficies de vidrio y plásticas, promoviendo la formación de biopelículas en los dispositivos médicos. Por otro lado, la presencia de pilis le proporciona la capacidad de adherirse a las células epiteliales contribuyendo a la colonización, invasión y resistencia. (Vidal *et al.*, 1997; Eijkelkamp *et al.*, 2011).

Se ha descrito que *A. baumannii* es capaz de persistir y sobrevivir en el entorno clínico formando biopelículas sobre diferentes superficies incluyendo superficies abióticas tales como muebles y equipos médicos. (McConnell *et al.*, 2012).

Estudios en la especie *A. baumannii* ATCC 19606, reportan que esta bacteria contiene genes que codifican para proteínas que hacen parte de un sistema de secreción, mediado por chaperonas que participan directamente en la formación del pili tipo I (Tomaras *et al.*, 2003; Tomaras *et al.*, 2008).

En 2011 Eijkelkamp y colaboradores encontraron que este grupo de genes, llamados *csu*, contribuyen a la formación de biofilm sobre superficies abióticas y se encuentran organizados en un operón policistrónico denominado *csuAB-A,B, C,D,E*. (Figura 1)

Figura 1: Mapa genético y físico del locus *csu* de *A. baumannii* ATCC 19606.



* Las flechas horizontales y números indican la ubicación y la dirección de la transcripción de los ORFs. (Imagen tomada de Tomaras *et al.*, 2008).

También se ha reportado que la expresión de los genes *csu* en *A. baumannii* ATCC 19606 está regulada por un gen llamado *bfmR*, el cual hace parte de un sistema de dos componentes. Este sistema tiene un papel importante en la morfología de *A. baumannii* ATCC 19606, en el montaje del pili y en su capacidad de formar biofilms en superficies abióticas, tales como el material de poliestireno. El gen *bfmR* se encuentra seguido de un ORF que codifica para un sensor quinasa nominado *bfmS*. (Tomaras *et al.*, 2008)

Este operón *csu* parece ser que se encuentra generalmente en los aislamientos clínicos de *A. baumannii*, indicando que este sistema de ensamblaje de pili tipo I, podría ser un elemento común para la formación de biofilms sobre superficies abióticas (McConnell *et al.*, 2012).

Se ha descrito otro tipo de pili en *A. baumannii* ATCC 17978, llamado operón *pap* (Eijkelkamp *et al.*, 2011). Este es un tipo similar al pili tipo I llamado P pili, ha sido

descrito como un factor de virulencia en *Escherichia coli* mediando la fijación a tejido renal llegando a causar pielonefritis. (Proft & Bake, 2009). Este operón *pap* (P pili) al igual que el operón *csu*, están ensamblados por un sistema de proteínas chaperonas periplásmicas y proteínas de membrana externa. (Marti *et al.*, 2011)

En una investigación sobre el crecimiento de *A. baumannii* en un biofilm se comprobó, a través de estudios proteómicos y por Microscopía de Fuerza Atómica (AFM), la expresión de potenciales factores de virulencia. Este tipo particular de biofilm requiere de múltiples sistemas de pili como son los dos mencionados anteriormente (*csu* y *pap*), además de un tercer sistema llamado pili tipo III, todos estos necesarios para mantener esta estructura cohesiva en la interfase aire-líquido Este sistema pili tipo III (*FilF*), es un tipo raro que ha sido descrito en *Burkholderia cepacia*, causante de fibrosis quística, presente en aislamientos clínicos no epidémicos. (Marti *et al.*, 2011).

Por otro lado, existe un sistema de pili tipo IV, el cual media la motilidad de la bacteria mediante un sistema por contracción (Eijkelkamp *et al.*, 2011). Este sistema tipo IV permite que la bacteria pueda adherirse a superficies tanto orgánicas como inorgánicas, incluyendo geles de agar, células epiteliales, plásticos, vidrio y metales (Mattick, 2002)

La biogénesis y la función de pili tipo IV es controlado por un gran número de genes, alrededor de 40 han sido identificados en *Pseudomonas aeruginosa*. Un número de estos genes necesarios para el montaje del pili, son homólogos a los genes implicados en las proteínas del sistema de secreción tipo II y la competencia para la adquisición de ADN, lo que sugiere que estos sistemas comparten una arquitectura común. La motilidad por contracción también está controlada por una serie de sistemas de transducción de señales, incluyendo sensores-reguladores de dos componentes y un sistema quimiosensor complejo. (Mattick, 2002; Eijkelkamp *et al.*, 2011)

El grupo de genes para el sistema de secreción de pili tipo IV codifican para proteínas que están involucradas en la formación de un canal que sirve para el transporte de aquellos factores de virulencia que la bacteria emplea como mecanismo de defensa y patogenicidad. Además este sistema tipo IV está involucrado en procesos de motilidad conjugación y transformación del ADN circundante (Llosa *et al.*, 2009).

A pesar de que *Acinetobacter* es no móvil, *A. baumannii* tiene varios genes esenciales de motilidad celular que hacen parte del sistema de pili tipo IV: genes de montaje del pilus (*pilB*, *pilW*, *pilL*, *pilJ*, *pilI*, *pilY1*, *pilQ*, *pilO*, *pilN*, *pilM*); genes de biogénesis fimbrial (*fimT*, *pilZ*) y genes motilidad (*pilU*, *pilT*) que son importante para la retracción pili. También se ha demostrado recientemente, que *A. baumannii* es móvil bajo ciertas condiciones, lo cual juega un rol importante en su capacidad para colonizar y extenderse en las superficies, para formar biopelículas (Peleg *et al.*, 2012)

En seis cepas de *A. baumannii* que se han secuenciado completamente, se ha encontrado el sistema de secreción tipo IV, como un elemento común a todas las cepas (Smith *et al.*, 2007; Vallenet *et al.*, 2008; Iacono *et al.*, 2008). Los sistemas de secreción tipo IV, que han sido reportados se encuentran relacionados con la diseminación de islas de patogenicidad (PAIs) en un amplio espectro de bacterias (Juhás *et al.*, 2007).

1.6.1.2 Superficie hidrofóbica

Se considera un importante determinante de protección frente a la fagocitosis y de adhesión a las células hospederas y a las superficies como catéteres y prótesis (Costa *et al.*, 2006; Bergogne-Berézín *et al.*, 2012). La adhesión bacteriana a los catéteres intravasculares es un factor que promueve el desarrollo de las bacteremias y septicemias (Paragioudaki *et al.*, 2004). Se ha demostrado que cepas de *A. baumannii* aisladas de catéteres y dispositivos traqueales, tienen una mayor hidrofobicidad comparadas con cepas aisladas de la piel de una persona sana (Bergogne-Berézín *et al.*, 2012)

1.6.2 Factores de colonización

Para que la bacteria pueda multiplicarse, debe encontrar en el hospedero las condiciones ambientales adecuadas como la temperatura y el pH. (Madigan *et al.*, 2006). Sin embargo, el factor más importante para el desarrollo de las bacterias, es la disponibilidad de nutrientes en el tejido del hospedero y estos no están disponibles para los microorganismos, en igual abundancia. Un mecanismo de defensa por parte del hospedero contra las bacterias, es el secuestro de estos nutrientes vitales, entre ellos algunos metales como el hierro, el cual es indispensable para que la bacteria pueda realizar sus procesos celulares, replicar su ADN, protegerse contra el estrés oxidativo y

poder causar una infección dentro del hospedero. (Skaar, 2010). Este suceso, crea una lucha por la obtención de este elemento entre el hospedero y la bacteria. Las bacterias pueden enfrentar un medio con condiciones limitadas de hierro, mediante la alteración de vías metabólicas y diversos sistemas de adquisición de hierro (Mortensen & Skaar, 2012). En *A. baumannii* estos sistemas de adquisición se asocian con la presencia de sideróforos.

1.6.2.1 Sideróforos

Las bacterias pueden adaptarse a entornos limitados de hierro a través de la expresión de varios mecanismos de adquisición. Una vía para la absorción de hierro implica la unión directa de Fe^{2+} a los receptores o proteínas de transporte que se encuentran sobre la superficie de la célula. Un segundo mecanismo de absorción de hierro, implica la producción y secreción compuestos quelantes de hierro de alta afinidad (sideróforos), que compiten con las células del hospedero por el hierro. (Eijkelkamp *et al.*, 2011)

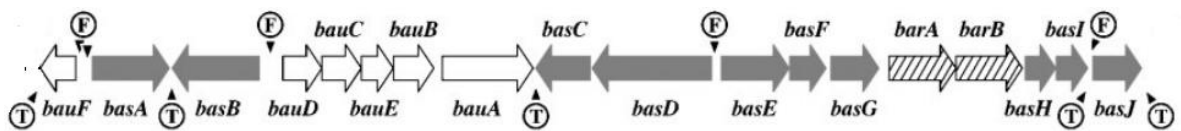
Los sideróforos forman complejos férricos para transportar el hierro a las células, por un proceso que requiere un receptor de la membrana externa, una proteína periplásmica y varias proteínas asociadas a membrana interna. Para el transporte del hierro a través de la membrana externa, se requiere de energía que es proporcionada por la interacción del receptor con el complejo *TonB*. Para transportar el sideróforo férrico a través de la membrana interna, la energía es proveída por la hidrólisis de ATP. La expresión de las proteínas requeridas para los sistemas de adquisición de hierro en la bacteria, incluyen enzimas para la biosíntesis de sideróforos, las cuales están siempre reguladas a nivel transcripcional por un represor global de unión al hierro proteína Fur (regulador de la captación de hierro) (Mihara *et al.*, 2004; Eijkelkamp *et al.*, 2011)

A. baumannii, es uno de los microorganismos asociados al cuidado de la salud, que tiene la capacidad de prosperar bajo condiciones limitantes de hierro, impuestas por el hospedero humano, produciendo sideróforos de alta afinidad por el mismo. (Penwell *et al.*, 2012). Análisis *in silico* de anotación de genomas completos y datos experimentales en *A. baumannii*, muestran que diversas especies de *A. baumannii* aisladas de ambientes clínicos, pueden expresar proteínas para la absorción de hierro a través de diferente sistemas. (Penwell *et al.*, 2012)

Hasta la fecha cinco grupos de genes involucrados en la biosíntesis de sideróforos han sido descritos en *A. baumannii*. De estos, el grupo de genes codificantes del sideróforo acinetobactin ha sido el más extensamente estudiado y el mejor sistema caracterizado para la cepa tipo *A. baumannii* ATCC 19606^T, y para cepas de esta misma especie con excepción de la cepa *A. buamannii* 8399. (Eijkelkamp *et al.*, 2011). Este tipo de sideróforo, está compuesto por cantidades equimoleculares de ácido 2,3-dihidroxibenzóico (DHBA); L-treonina y N-hidroxihistamina, los dos primeros componentes forman un anillo de oxazolina. Acinetobactin es estructuralmente cercano a anguibactin, un sideróforo que se encuentra en un plásmido de *Vibrio anguillarum*, la única diferencia es que acinetobactin tiene un anillo de oxazolina, mientras que el de *Vibrio anguillarum* posee un anillo de tiazolina. Acinetobactin también es similar a vibriobactin producido por *Vibrio cholerae* (Mihara *et al.*, 2004)

Análisis RT-PCR sugieren que el grupo acinetobactin (Ab), incluye 18 genes que están organizados en siete unidades transcripcionales, precedidos de los respectivos reguladores Fur, regiones promotor-operador. Dentro de este *cluster* de acinetobactin se encuentran los genes *bas ABCDEFGHIJ* (encargados de la biosíntesis de acinetobactin), genes *bau ABCDEF* (encargados del transporte de acinetobactin al citosol) y los genes *bar A* y *bar B* (encargados de la liberación de este sideróforo) (Mihara *et al.*, 2004). (Figura 2). Se ha reportado para cepa *A. baumannii* ATCC19606, que este grupo de genes se encuentra en una región cromosómica de 26,5-kb sin embargo, esta región puede variar dentro de las especies de *A. baumannii* ya que algunas de ellas poseen, dentro de este grupo de genes, otros genes que codifican para proteínas hipotéticas. (Penwell *et al.*, 2012)

Figura 2. Organización genética del *cluster* acinetobactin en *A. baumannii* ATCC 19606.



*Las ubicaciones, las direcciones de transcripción y los tamaños relativos de los genes individuales se indican por flechas. Los genes *bau* se muestran mediante flechas en blanco, los genes *bas* por flechas grises; los genes *bar* por flechas rayadas. Las letras F y T en mayúscula encerradas en un círculo indican la ubicación de cajas putativas Fur y las señales de terminación de la transcripción, respectivamente. (Imagen tomada de Mihara *et al.*, 2004)

Por otro lado, la completa biosíntesis de DHBA en la bacteria, desde el corismato, requiere de los productos de los genes *entC*, *entB* y *entA* los cuales se encuentran en un regulón controlado por Fur en *E. coli*. En *A. baumannii* los homólogos de los genes (*entC* y *entB*) son los genes *basF* y *basJ*. (Mihara *et al.*, 2004)

Un aspecto importante por destacar, y que se ha encontrado en común en las especies de *A. baumannii*, es que el grupo de genes que están asociados con la biosíntesis del sideróforo de acinetobactin, no incluye el gen ortólogo *entA* que codifica para la 2,3-dihidro-2,3-dihidroxi-benzoato deshidrogenasa. Este gen codifica para una enzima muy importante, dado que está implicada en el último paso de la conversión del corismato en DHBA y por ende, es esencial para la biosíntesis del catecol de sideróforos, tales como enterobactina. Se ha reportado que este gen se localiza dentro de otro grupo diferente de genes, que codifican para una proteína putativa que contiene un dominio isocorismatasa liasa, y que es necesaria para la biosíntesis de DHBA a partir del ácido isocorísmico. (Penwell *et al.*, 2012)

Además del grupo de acinetobactin, se ha descrito otro grupo de genes que conforman un sideróforo putativo que se ha encontrado conservado entre las especies de *A. baumannii* ATCC 17978; ATCC 19606; AYE; AB0057; ACICU; 307-0294; D127 y WM99c. Este grupo, está integrado por 8 genes con una función putativa en la biosíntesis del sideróforo. (Eijkelkamp *et al.*, 2011)

1.6.3 Factores de invasión

Para que la bacteria pueda invadir y causar un proceso infeccioso, esta debe tener elementos que le permitan defenderse de las respuestas inmunológicas del hospedero y elementos que le den la capacidad de causar daño a las células del huésped. En *A. baumannii* se pueden encontrar los siguientes factores asociados a la virulencia:

1.6.3.1 Fosfolipasas

Fosfolipasas bacterianas son enzimas lipolíticas que catalizan la hidrólisis de los fosfolípidos. Estas enzimas se han considerado y se han venido estudiando como elementos de la patogénesis de las bacterias Gram negativas. Se ha descrito que estas enzimas contribuyen en la lisis de las células huésped, a través del rompimiento de los

fosfolípidos que se encuentran en la membrana de la célula huésped, facilitando la invasión bacteriana. (McConnell *et al.*, 2012)

En el genoma de *A. baumannii*, se ha comprobado que la interrupción de uno de los dos genes fosfolipasa D, presentes en el genoma, disminuye la capacidad de la bacteria para invadir las células epiteliales (Jacobs *et al.*, 2010). Además, se ha demostrado a través de experimentos con un modelo murino de neumonía, que la fosfolipasa D (*pld*), es un determinante genético que contribuye en la habilidad de la bacteria para sobrevivir al suero humano, invadir células epiteliales y aumentar su virulencia. Se ha descrito que la fosfolipasa C aumenta la toxicidad en las células epiteliales. En los genomas secuenciados de *A. baumannii* hasta la fecha se han identificado dos genes putativos de esta clase de fosfolipasas (Jacobs *et al.*, 2010; Antunes *et al.*, 2011)

Otras enzimas que pueden estar relacionadas con la virulencia de *Acinetobacter baumannii* son las esterasas, ciertas amino-peptidasas, ureasas y fosfatasas ácidas. La fuerte actividad de las esterasas, hidrolizan cadenas cortas de ésteres de ácidos grasos que pueden contribuir a la habilidad de dañar el tejido adiposo. También, la actividad ureasa, en *Acinetobacter* ayuda a la bacteria a colonizar el estómago induciendo inflamación (Bergogne-Berézín *et al.*, 2012)

1.6.3.2 Cápsula

Aunque las cápsulas son innecesarias para el crecimiento de las bacterias, revisten una gran importancia para su supervivencia en el hospedero. La cápsula es poco antigénica y antifagocítica, y es considerada un factor de virulencia significativo (Murray *et al.*, 2009).

La cápsula bacteriana se compone principalmente de los antígenos K y antígenos O, que se asemejan a los lipopolisacáridos. Cada clase de antígenos tiene variados serotipos por las diferentes composiciones de azúcares y uniones específicas. Los antígenos K se dividen en dos grupos I y II basados en sus propiedades serológicas. La naturaleza hidrofílica de cada cápsula de la bacteria contribuye a la protección de la misma frente a la desecación, protección frente a la fagocitosis por las células del sistema inmune del hospedero y protección como una barrera física contra la infección de bacteriófagos.

Además, la presencia de cápsula ayuda a la bacteria a adherirse a las superficies y formar biofilm (Naimi *et al.*, 2009).

Se han identificado, en la cepa de *A. baumannii* AB307-0294, dos genes que son necesarios para la polimerización y ensamblaje de la cápsula. El gen *ptk*, codifica para una proteína putativa de tirosina kinasa (*PTK*) y *epsA*, el cual codifica para una proteína de membrana externa, exportadora de polisacáridos (*EpsA*). Russo y cols. (2010) establecieron que estos genes se requieren para un fenotipo de cápsula positiva y que es un factor importante en la patogenicidad de la infección de *A. baumannii*, ya que optimiza el crecimiento en ascitis humana y la supervivencia *in-vitro* en el suero humano y en un tejido blando de rata como modelo de infección.

1.6.3.3 Proteínas de membrana externa (OMPs)

Las proteínas de membrana externa juegan un papel clave en la traducción de señales, adhesión y patogénesis (Vashist *et al.*, 2009)

Dentro de estas proteínas de membrana externa la más estudiada en *A. baumannii*, es la *Opm38 (ompA)*, una porina trimérica involucrada en el transporte de solutos y que ha sido vinculada con apoptosis celular de las células epiteliales. (Bergogne-Berézín *et al.*, 2012) La evidencia de que la *OmpA* de *A. baumannii* constituye un factor de virulencia se obtuvo en una búsqueda aleatoria por mutagénesis del transposón de *A. baumannii* deficiente en la inducción de la apoptosis en células epiteliales humanas de laringe HEp-2. Choi y cols. (2005) estudiaron la acción de esta proteína y reportan que la *Omp38* purificada entra en las células y se localiza en la mitocondria, dando lugar a una liberación de moléculas proapoptóticas como el citocromo c y factor inductor de apoptosis (AIF). Estos resultados llevaron a sugerir que esta puede ser una vía por la que *A. baumannii* induce daño en células humanas, interrumpiendo el revestimiento mucoso y permitiendo el acceso de la bacteria o productos de las bacterias a los tejidos profundos de las vías respiratorias, durante la etapa temprana de infección.

Otros estudios tanto genómicos como proteómicos que complementan el conocimiento acerca de los factores de virulencia encontrados en *A. baumannii* se presentan a continuación:

Smith y cols. (2007), analizaron en el genoma de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978, los genes asociados con la virulencia, detectaron 28 islas alienígenas adquiridas por transferencia horizontal de genes (HGT por su siglas en inglés) de las cuales 20 se relacionan con genes que codifican proteínas de virulencia; con proteínas de secreción; proteínas involucradas en la formación de pilis y en la biogénesis de la pared celular.

lacono y cols. (2008), en un estudio sobre genómica comparativa entre una especie *A. baylyi* y dos *A. baumannii* (ACICU y ATCC 17978), identificaron en *A. baumannii* ACICU 36 islas putativas denominadas pACICU1-36, de las cuales 24 mostraron similitud con las descritas en *A. baumannii* ATCC 17978 y además, encontraron que 5 de estas islas (pACICU) están relacionadas con elementos de virulencia como son: biosíntesis de pilis, hemolisinas y proteínas de adhesión a superficies.

Vallenet y cols. (2008), en el análisis comparativo de dos genomas de *A. baumannii* (AYE, SDF) y el genoma de ADP1 (*Acinetobacter baylyi*) y encontraron factores clave que juegan un papel durante la infección como son: la formación de biofilm, adquisición de hierro, quórum sensing y otros factores de virulencia. Adicionalmente encontraron diferencias respecto a los sistemas de adquisición del hierro en donde AYE y ADP1 usan sistemas similares, mientras SDF emplea un sistema alternativo al utilizado por las otras dos cepas, sugiriendo que estos factores se desarrollan dependiendo el nicho ecológico donde se encuentren.

Pero no solo los estudios genómicos se han enfocado en factores de virulencia, Shin y cols. (2009), determinaron en cepas clínicas de *A. baumannii* multi-resistentes, las proteínas que estaban reguladas para la formación del biofilm y realizaron el estudio de proteínas de la membrana externa utilizando electroforesis bidimensional (2-D) y espectrometría de masas MALDI-TOF. Las proteínas encontradas en la formación de biofilm fueron: proteínas involucradas en su mayoría en sistemas transportadores del Fe (*TonB-dependientes*) asociadas con factores de virulencia; proteínas relacionadas con resistencia a los antibióticos y proteínas involucradas en el metabolismo. Este análisis proteómico constituyó una plataforma fundamental para otros estudios posteriores.

Jin y cols. (2011), demostraron que *A. baumannii* secreta factores de virulencia vía vesículas de membrana externa (OMVs), cuando se cultivan *in-vitro*. También, evaluaron

la actividad citotóxica de la proteína de membrana externa AbOmpA empaquetada en vesículas en *A. baumannii* ATCC 19606 durante la infección *in-vivo*, en un modelo de ratones inmunosuprimidos, llegando a la conclusión que AbOmpA es una molécula citotóxica de las más potentes en las OMV de *A. baumannii*. Este estudio también permitió determinar que el contenido de las OMV, se entrega a las células hospederas a través de: receptores mediados por vía endocítica o la fusión con membranas de la célula hospedera.

Además de estas investigaciones, Jin y cols (2011), mediante un análisis proteómico de las OMVs de la cepa *A. baumannii* ATCC 19606, identificaron varios factores de virulencia como: *AbOmpA*, *CsuA / BCD*, *Cu / Zn* superóxido dismutasa, proteínas relacionadas con la biosíntesis de las fimbrias, el sideróforo de bacterioferritina, la superfamilia de bombas de eflujo RND y una posible proteasa, entre otras.

Antunes y cols. (2011), aportaron al conocimiento sobre la virulencia de *A. baumannii* empleando como modelo experimental la polilla *Galleria mellonella* para comparar y evaluar la virulencia de las cepas de *A. baumannii* AYE, ACICU, ATCC 17978 y SDF, concluyendo que no hay diferencias significativas en la virulencia entre las cepas clínicas, excepto la cepa SDF, aislada del piojo, que fue prácticamente avirulenta en este modelo. Estos resultados sugieren que esta cepa podría ser utilizada como un posible control negativo de patogenicidad en la búsqueda de nuevos determinantes de virulencia en *A. baumannii*.

Estos aportes sobre la virulencia de *A. baumannii* han sido relevantes para el conocimiento de la patogenicidad de esta bacteria, y sirven de base para esta investigación y para posteriores estudios.

2. Capítulo 2: Objetivos

2.1 General

Analizar genómica y funcionalmente en membrana externa el infectoma de una cepa de *Acinetobacter baumannii* 107m multirresistente aislada de un hospital de Bogotá

2.2 Específicos

- Identificar los genes codificantes del infectoma en el genoma de una cepa *A. baumannii* 107m multirresistente aislada de un hospital de Bogotá.
- Comparar la expresión proteínas consideradas factores de virulencia presentes en la membrana externa de la cepa multirresistente de *A. baumannii* 107m con la expresión de los mismos factores en la cepa *A. baumannii* ATCC 19606.
- Comparar los datos obtenidos del análisis bioinformático del infectoma y el perfil de las proteínas de membrana externa de la cepa de estudio, con los reportados en las bases de datos y publicaciones internacionales para *Acinetobacter baumannii*.

3. Capítulo 3: Metodología

Para llevar a cabo la identificación de los genes codificantes de factores de virulencia, se partió de la cepa *A. baumannii* 107m multirresistente, que se encuentra conservada a -70° C en el laboratorio de Epidemiología Molecular, del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia

La cepa *A. baumannii* 107m hace parte de los 129 aislamientos de hospitales de Bogotá de un grupo de veinte cepas de *A. baumannii* multirresistentes que fueron recolectados en el periodo comprendido entre los años 2004 y 2009 por el grupo de Epidemiología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia. La cepa *A. baumannii* 107m fue aislada de una muestra de sangre y fue causante de una bacteremia. Esta cepa fue previamente identificada a través del sistema automatizado VITEK (BioMerieux S.A, France), y molecularmente caracterizada mediante el análisis de los polimorfismos en longitud de los fragmentos de restricción (RFLP-PCR), y de la región intergénica espaciadora (ITS) de los genes 16S rRNA y 23S rRNA (Hernández *et al.*, 2011). El perfil de resistencia de la cepa de estudio se puede encontrar en el anexo A

Se siguió el siguiente protocolo experimental:

3.1 Obtención del ADN total de *A. baumannii* 107m

3.1.1 Cultivo de la bacteria

El cultivo se inició con la siembra, en placas de agar Luria Bertani (LB). Después de sembrar bajo condiciones asépticas se llevó a incubar a 37° C toda la noche. Al siguiente día se colocaron en un matraz, 15 ml de caldo Luria Bertani y se inocularon aproximadamente 5 colonias de la siembra anterior. Se colocó en un agitador a 37°C con una velocidad de agitación de 150 rpm, hasta obtener una densidad óptica entre 0.8 a 1 medida a una longitud de onda de 600nm la cual se obtuvo en un lapso entre 4 y 5 horas.

3.1.2 Aislamiento del ADN

El aislamiento del ADN bacteriano se realizó disponiendo todo el cultivo en un tubo Falcon y se centrifugó a 3500g por 2 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el pellet obtenido se resuspendió en 1,5 ml de solución salina (isotónica). Esta suspensión se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml nuevo y estéril, pesado previamente. Se centrifugó a 7500 rpm por 2 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y se adicionaron 1,5 ml de solución salina isotónica (este paso se repitió una vez más).

Finalmente se resuspendió el pellet en 500 µl de buffer TE estéril y se centrifugó a temperatura ambiente (15°C-25°C) por 5 minutos a 4000g. Posteriormente se pesó el eppendorf con el pellet, restándole el peso del tubo, para calcular el peso total del pellet obtenido. Es recomendable que el peso del pellet esté, aproximadamente entre 50 y 60 miligramos.

3.1.3 Obtención del ADN

Después de obtener el pellet se procedió a realizar la lisis celular, para ello, se siguieron las indicaciones proporcionadas por el fabricante del QIAamp DNA Mini Kit. (Anexo B)

3.1.4 Purificación del ADN

Para purificar el ADN obtenido, se utilizó una columna del kit Quiagen® siguiendo las instrucciones consignadas en el manual del fabricante. (Anexo C)

3.1.5 Concentración ADN

Para obtener la concentración adecuada para la secuenciación del ADN (150-300 ng/ul), se utilizó un centricon o concentrador de 100 k. Antes de colocar el ADN en el centricon, se lavó el equipo tres veces con agua HPLC, utilizando en cada ocasión 2 ml de agua, centrifugando a 1000 g por 10 minutos. Una vez finalizado el proceso de lavado se procedió a colocar el ADN en el centricon y se centrifugó a 1000 gravedades, por 10 minutos. Este paso se repitió hasta que se obtuvieron aproximadamente 150 µl en la parte superior del centricon. Se transfirieron los 150 µl a un tubo nuevo y estéril; el centricon se lavó con 50 o 100 µl de agua HPLC los cuales se mezclaron ligeramente para obtener el ADN adherido a la membrana y se adicionaron al tubo anterior.

3.1.6 Cuantificación del ADN

Se hizo por fluorimetría utilizando el fluorómetro Qubit de Invitrogen mediante el Kit Quant iT dsDNA y por el Nano-drop utilizando el sistema de Thermo Scientific NanoDrop 2000 (Anexo D)

El ADN obtenido se envió a Macrogen (Corea) para su secuenciación de alto rendimiento por Illumina (HiSeq 2000) finales pareados y 454 Roche con finales pareados

3.2 Anotación

Antes de llevar a cabo la búsqueda de los genes codificantes de factores de virulencia en *A. baumannii* 107m se hizo una revisión de la literatura sobre estudios genómicos, proteómicos en relación con los factores involucrados en la virulencia y patogenicidad de la especie de *A. baumannii*. El análisis de la bibliografía encontrada se organizó en una tabla de datos, en la cual se consignaron los genes codificantes de estos factores reportados con mayor frecuencia para esta especie (Anexo E). Posterior a esto, se elaboró una segunda tabla de datos con los genes que codifican para proteínas involucradas en virulencia identificadas en las cepas de *A. baumannii* reportadas y anotadas en la base de datos NCBI. (Estos datos se pueden encontrar en la página web del grupo de bioinformática de la Universidad Nacional de Colombia. (<http://bioinf.ibun.unal.edu.co.ibu.edu.co>) Para la búsqueda de los genes y las proteínas se utilizaron las bases de datos internacionales como Genbank, Uniprot y PDB.

Alternó a la revisión bibliográfica, el grupo de bioinformática de la Universidad Nacional de Colombia, una vez obtenidas las lecturas (*reads*) por el servicio de secuenciación (Macrogen – Korea) las sometió a control de calidad mediante los programas FASTQC (1) y fastx_toolkit (2). Para el ensamblaje del resultado de Illumina utilizó el programa Velvet, para el *scaffolding* realizó *unmapping* utilizando el programa Newbler 2.7, alineando las secuencias obtenidas por secuenciación 454, con los *contigs* previamente ensamblados con Velvet. Se utilizaron dos metodologías: *Mapping* y *de novo*. Para el *mapping* se usó el programa BWA (Burrows-Wheeler Aligner – Li, 2009) y la comparación

del genoma se hizo contra los genomas de referencia, *A. baumannii* ACICU y *A. baumannii* ATCC 17978 (Iacono *et al.*, 2008).

La secuencia ensamblada se sometió a la anotación automática mediante el NCBI Prokaryotic Genomes Automatic Annotation Pipeline (PGAAP) (4), y por el servidor RAST 4.0 (5) del National Microbial Pathogen Data Resource (NMPDR). El sistema PGAAP - NCBI y el servidor RAST proporcionaron como resultado los archivos de anotaciones de cada *contig* en formato GenBank (archivo *.gbf) el cual contiene toda la información de anotación de los *contigs*. La anotación automática fue refinada por anotación manual sobre los archivos *.gbf, utilizando para su visualización y edición el software Artemis 14.0.

De la secuenciación, ensamblaje, finalización y anotación del genoma se obtuvieron los siguientes resultados:

A. baumannii 107m tiene 3.954.000 pb ensamblados inicialmente en 56 *contigs*. El proyecto de secuenciación de este genoma se identifica en la base de datos BioProject con el número: PRJEB4505 (*A. baumannii* 107m). La secuencia fue depositada en DDBJ/EMBL/GenBank bajo el siguiente número de acceso: *A. baumannii* 107m (CBSG000000000)

Sobre el genoma ensamblado y anotado por el Grupo de Bioinformática del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, se procedió a identificar los marcos de lectura asociados con factores de virulencia.

Finalmente, con la información obtenida de la anotación descrita en un archivo formato Genbank, se inició la búsqueda manual de los genes codificantes de factores de virulencia en el genoma de *A. baumannii* 107m, teniendo como base la información encontrada previamente sobre estos genes, en las bases de datos de Genbank, Uniprot y en estudios genómicos reportados para esta especie. (Smith *et al.*, 2007; Vallenet *et al.*, 2008; Iacono *et al.*, 2008). Posterior a ello, se elaboró una lista con los nombres de los genes identificados, colocando los nombres, la posición dentro del *contig* y el número de identificación (ID) de cada uno de los genes de la cepa de estudio que se encontrarán más adelante.

3.3 Obtención de la fracción de proteínas de membrana externa de la cepa *A. baumannii* 107m y de la cepa de *A. baumannii* ATCC 19606

La comparación de la expresión de proteínas de membrana externa asociadas a factores de virulencia se hizo entre la cepa *A. baumannii* 107m (descrita anteriormente) y *A. baumannii* ATCC 19606, una cepa sensible que se encuentra conservada en el laboratorio de Epidemiología Molecular, la cual según literatura fue aislada originariamente de una muestra de orina en 1942 y ha sido utilizada en investigaciones de proteómica y genómica para estudios de resistencia y virulencia. (Siroy *et al.*, 2006; Vashist *et al.*, 2009; Rodriguez, 2010; Nwugo *et al.* 2011; Sahl *et al.*, 2013) Se siguió un diseño de estudio experimental, descriptivo y retrospectivo.

3.3.1 Extracción proteínas de membrana externa (Molloy *et al.*, 2000)

Para llevar a cabo este procedimiento se tomaron sendas colonias de un cultivo de la cepa *A. baumannii* ATCC 19606 y de un cultivo de la cepa *A. baumannii* 107m; se hicieron preinóculos en 50 ml de caldo Luria Bertani (LB) y se dejaron toda la noche a 37 °C, con agitación de 200 rpm.

De cada preinóculo se tomaron 5 ml y se inocularon en 500 ml de caldo LB y se incubaron a 37 °C, con agitación de 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 0.8 medida a 600 nm. Esta etapa se realizó por con el fin de obtener una concentración de aproximadamente 1000ug/ml de proteína para efectuar los ensayos de la electroforesis bidimensional por triplicado.

Una vez alcanzada la densidad óptica requerida, se pasaron los cultivos a frascos de 1000 ml y se centrifugaron a 5000 rpm por 20 minutos a 4 ° C. Se eliminaron los sobrenadantes. Los pellets se lavaron con 9 ml de una solución salina isotónica para eliminar impurezas. Nuevamente las muestras se centrifugaron a 16000 g por 20 minutos a 4° C y se eliminaron los sobrenadantes.

Por cada 200 mg de peso de pellet obtenido, se adicionó 1 ml de buffer (Tris HCl 50 mM pH 11) para resuspender la muestra.

Las muestras se sonicaron, con el fin de romper las células y fragmentar el ADN, para lo cual se usaron pulsos de 9 segundos durante 12 minutos. Este procedimiento se llevó a cabo manteniendo las cepas en hielo todo el tiempo. Posteriormente el producto de la sonicación se centrifugó a 16000 g por 15 a 20 min. (4°C), con lo que se removió el material insoluble, así como las células no rotas. Los sobrenadantes resultantes, se adicionaron a un frasco de vidrio schott que contenía 60 ml del reactivo concentrador de proteínas de membrana (carbonato de sodio (Na₂CO₃) 100 mM), hasta un volumen final de 90ml. Las suspensiones se mantuvieron ON (Overnigth) sobre hielo en agitación suave.

Después de este tiempo las muestras fueron transferidas a tubos de ultracentrífuga y se centrifugaron a 100 000 g por 60 min. a 4°C. Posteriormente, se marcó la posición de los pellets y cuidadosamente se descartó el sobrenadante.

Se lavó cada pellet con 1 ml de buffer de lisis frío (Tris HCl 50 mM pH 11). Se conservaron en hielo durante 1 -2 min. Este paso se repitió dos veces.

Se adicionó 1 ml del buffer de isoelectroenfoco para disolver el pellet. Este buffer contiene agentes caotrópicos como urea o tiourea que provocan la desnaturalización de las proteínas, por la ruptura de puentes de hidrógeno, dejando expuestos los residuos hidrofóbicos; un detergente zwitterión ASB 14, para la solubilización de proteínas hidrofóbicas y terbutil fosfina (TBS), como agente reductor que completa la desnaturalización proteica por ruptura de puentes disulfuro. Finalmente, se pasaron las soluciones a un tubo ependorf de 2 ml y se centrifugaron a 16.000 g por 20 minutos a 4°C y se separaron los sobrenadantes.

3.3.2 Cuantificación de las proteínas de membrana externa

La cuantificación de las proteínas de membrana externa, se llevó a cabo mediante un ensayo colorimétrico, el cual se fundamenta en la unión de la proteína a un complejo

cromóforo-metal en condiciones alcalinas. De esta manera, la intensidad del color resultante es proporcional a la concentración de proteínas. La concentración de la muestra se determinó mediante interpolación de los valores obtenidos en una curva patrón albúmina de suero bovino (BSA). Para esta determinación se utilizó el kit de Pierce®, Thermo Scientific.

3.3.3 Electroforesis bidimensional

Para realizar este procedimiento se utilizaron tiras secas con gradientes de pH inmovilizado (IPG) de 7cm de Bio-Rad®. Al inicio de los ensayos se utilizaron tiras con un rango de pH de 3 a 10, pero se observó que la mayoría de las proteínas para las dos cepas en estudio, se encontraban dentro de los pH ácidos. Finalmente se trabajó con tiras con un rango de pH de 4 a 7 para obtener una mayor resolución de los spots. Cada ensayo se realizó por triplicado.

3.3.3.1 Primera dimensión: isoelectroenfoque

Se realizó la rehidratación de las tiras colocando las tiras de pH 4 -7 de Bio-Rad® en bandejas de rehidratación y se añadió un volumen de 6 ul de muestra de proteína de membrana externa correspondiente a 70 ug de proteína y se completó a un volumen de 125 ul con buffer de isoelectroenfoque. Las tiras fueron rehidratadas por 30 minutos, después se cubrieron con aceite mineral (Bio-Rad®) y se dejaron rehidratando por 16 horas.

Después de este tiempo se colocaron en el equipo de isoelectroenfoque de Bio-Rad® bajo las siguientes condiciones recomendadas en el manual del proveedor ReadyPrep™ 2-D Starter Kit , para tiras de 7 cm y que consiste en:

- S1: 250V lineal 30 minutos
- S2: 1000V lineal 30 minutos
- S3: 4000V lineal 2 horas
- S4: 12000V rampa rápida, 12 horas
- S5: 500V rampa rápida 15 minutos

3.3.3.2 Segunda dimensión: separación por tamaño

Una vez terminado el isoelectroenfoco se procedió a realizar la segunda dimensión. Para ello, se prepararon geles de acrilamida-bisacrilamida al 12 %. Antes de colocar las tiras en la cámara de electroforesis 2D, estas fueron lavadas: primero con buffer de equilibrio 1 que contiene ditioneitol (DTT- agente reductor) (800 ul por 20 minutos), segundo, con buffer de equilibrio 2 que contiene iodoacetamida, que previene la oxidación de los grupos disulfuro separados por el DTT (800 ul por 20 minutos) y tercero con 1 ml de buffer de corrido el cual contiene Tris base, glicina y SDS (las muestras se dejaron en agitación por 5 minutos).

Una vez finalizado el tratamiento con las tiras, estas se colocaron en la cámara de electroforesis vertical DODECA (Bio-Rad®) y se corrieron a 120 V por 2 horas.

Terminada la electroforesis 2D, los geles se colorearon. Para este proceso se colocaron los geles en bandejas con 10 ml del colorante ORIOLE™ Fluorescent Gel Stain (Bio-Rad®), se dejaron por 2 horas, se lavaron con agua destilada y luego se observaron en el fotodocumentador GeneSnap

Se hicieron tres ensayos para comprobar la reproducibilidad de las condiciones seleccionadas para el proceso de electroforesis bidimensional.

3.3.4 Análisis de los geles bidimensionales

El análisis de los geles se realizó a través del software PDQuest de Bio-Rad®. Las imágenes fueron adquiridas a través del fotodocumentador GeneSnap y se guardaron bajo el formato TIFF. Posteriormente, las imágenes fueron corridas en el software PDQuest. Antes de iniciar el análisis fue necesario establecer el tamaño y la orientación de las imágenes mediante el uso de las herramientas de recorte y rotación en el menú Imagen.

Una vez organizadas las imágenes, se procedió a la detección de los *spots*. Para ello, se creó un archivo en donde se colocaron las imágenes (triplicado 107m y triplicado 19606)

y se utilizó la herramienta del software PDQuest Spot Deteccion Wizard, para seleccionar los parámetros de detección de *spots* en los geles escaneados. Esta herramienta automáticamente escogió una de las imágenes (la que tenía menos ruido de fondo) identificada como gel maestro. Sobre esta imagen se establecieron los parámetros de detección y además se eliminó el ruido de fondo, rayas horizontales y verticales y el *background* que pudiera interferir con el análisis y la detección de los *spots*. Una vez creado y guardado el conjunto de parámetros se inició la detección de *spots* en la imagen. Estos mismos parámetros fueron usados para detectar los *spots* en todos los geles que fueron realizados y escaneados de la misma manera. También se llevó a cabo un análisis de *matching* (apareamiento) mediante la herramienta de Automated Matching y manual Matching con el fin de realizar comparaciones entre las dos cepas *A. baumannii* 107m y *A. baumannii* ATCC 19606.

Finalmente, con base en los resultados obtenidos por el software PDQuest, se seleccionaron los *spots* diferencialmente expresados (con una expresión de +/- 2) para su posterior identificación. Estos *spots* fueron cortados de los geles y enviados en tubos eppendorf al Instituto Pasteur de Montevideo Uruguay, para su análisis por espectrometría de masas.

3.3.5 Espectrometría de masas

El método elegido para la identificación de proteínas fue el mapeo peptídico. Para ello se realizó un tratamiento con tripsina en cada *spot*, durante toda la noche a 37°C. Después de este tiempo, los péptidos los extrajeron de los geles utilizando 60% de acetonitrilo en TFA al 0,2%, se incubaron por 30 minutos a 30 °C y se concentraron por secado al vacío durante aproximadamente 45 minutos a 30 °C; posteriormente fueron secados y desalinizados usando micro-columnas C18 de fase reversa (OMIX). La elución de los péptidos de las micro-columnas fue llevada a cabo directamente dentro de la placa de muestra del espectrómetro de masas, con 2.5 µl de solución matriz (ácido α-ciano-4-hidroxicinámico en 60% de acetonitrilo/0.1% con TFA).

Los espectros de masas de mezclas de digestión fueron adquiridos en un instrumento 4800 MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems®) en el modo reflector y se calibraron externamente utilizando una mezcla de estándares de péptidos (Applied Biosystems®). Inducida por la colisión de disociación MS / MS de los péptidos seleccionados.

Finalmente, para identificar las proteínas se hizo una búsqueda en bases de datos locales utilizando los valores m/z, con ayuda del programa MASCOT y con los siguientes parámetros de búsqueda: tolerancia de masas monoisotópica, 0.08 Da; oxidación de metionina, como posible modificación. Los espectros de masas obtenidos para cada una de las proteínas analizadas, junto con los parámetros utilizados para su identificación están consignados en el anexo F

3.4 Comparación de los genes asociados a virulencia en la cepa *A. baumannii* 107m con los reportados en la base de datos

Para realizar la comparación de los marcos de lectura asociados con factores de virulencia identificados en la cepa *A. baumannii* 107m, se escogieron 2 cepas de *A. baumannii* multirresistentes y 2 cepas de *A. baumannii* sensibles teniendo en cuenta las siguientes características:

- Ubicación geográfica de donde fueron aisladas
- Lugar de donde se tomo la muestra
- Que sus genomas estuvieran completamente secuenciados y anotados.
- Que fueran causantes de infecciones asociadas al cuidado de la salud.
- Que hubiesen estudios previos en genómica sobre genes asociados con la virulencia. Las características de las cepas se pueden observar en la (Tabla 16)

Se realizó la siguiente metodología:

- Se compararon las secuencias de los genes codificantes de factores de virulencia identificados en la cepa en estudio, con los genomas escogidos (ACICU, AYE, AB0057 y ATCC 19606), utilizando técnicas de alineamiento de secuencias (Blast) y se evaluó el porcentaje de similitud.
- A través de la herramienta de WebACTse evaluó la sintenia, comparando la organización de los genes dentro del genoma en estudio con los genomas de *A. baumannii* ACICU, AYE, AB0057 y ATCC 1960
- A través de la herramienta Mauve se identificó la ubicación de los grupos de genes comparando el genoma de *A. baumannii* 107m con los genomas *A. buamannii* ACICU, *A. baumannii* AB0057, *A. baumannii* ATCC 19606 y *A. baumannii* ATCC 17978

4. Capítulo 4: Resultados

Primer objetivo: Identificación genes codificantes de factores de virulencia

Partiendo de la información obtenida por el proceso de secuenciación, ensamblaje y anotación que dió como resultado 56 *contings* del genoma de *A. baumannii* 107m, se identificaron a través de una búsqueda manual, los genes codificantes de factores de virulencia (relacionados con el infectoma) previamente encontrados en revisiones bibliográficas y en bases de datos públicas (NCBI, Uniprot)

A continuación se presenta la información de los genes codificantes de proteínas asociadas a virulencia en la cepa de *A. baumannii* 107m

4.1 Genes codificantes de sistemas de adherencia y motilidad

De los sistemas que le permiten a *A. baumannii* 107m adherirse a superficies bióticas y abióticas se encontraron en el genoma en estudio 30 genes codificantes de pili tipo IV; 2 operones codificantes del sistema de pili tipo I, que constituyen el operón *pap* compuesto por 4 genes y el operón *csu* compuesto por 6 genes y un gen codificantes del pili tipo III llamado *fil F*. Ver tablas 2, 3, 4 y 5

Tabla 2: Grupo de genes codificantes del sistema pili tipo IV *A. baumannii* 107m

| Conting | Gen | Función | pb | Posición | Identificación |
|---------|---------------------------|--|------|--------------|----------------|
| Node-4 | <i>piR</i> | Type 4 fimbriae expression regulatory protein | 1422 | 47040..48461 | ABIBUN_01307 |
| Node-4 | <i>piS</i> | Signal transduction histidine kinase | 1524 | 48486..50009 | ABIBUN_01312 |
| Node_12 | <i>puO</i> <i>/piD</i> | Type 4 prepilin-like proteins leader peptide-processing enzyme | 861 | 50833..51693 | ABIBUN_01752 |

Tabla 2: (Continuación)

| Conting | Gen | Función | pb | Posición | Identificación |
|----------------|---------------------------|---|------|----------------|----------------|
| Node_12 | <i>pilC</i> | Type II secretory pathway | 1227 | 51693..52919 | ABIBUN_01757 |
| Node_12 | <i>pilB</i> | Type IV-A pilus assembly ATPase PilB | 1713 | 52948..54660 | ABIBUN_01762 |
| Node_7 | <i>comE</i> A | DNA uptake protein and related DNA-binding protein | 411 | 80603..81013 | ABIBUN_03109 |
| Node_37_AN | <i>comL</i> | DNA uptake lipoprotein | 1158 | 185712..186869 | ABIBUN_04334 |
| Node_125 | <i>pilU</i> | Tfp pilus assembly protein, ATPase PilU | 1119 | 26017..27135 | ABIBUN_05017 |
| Node_125 | <i>pilT</i> | Tfp pilus assembly protein, pilus retraction ATPase PilT | 1038 | 27163..28200 | ABIBUN_05022 |
| Node_5 | <i>pilZ</i> | Tfp pilus assembly protein PilZ | 342 | 53153..53494 | ABIBUN_08670 |
| Node_22_B_N_52 | <i>comE</i> C/Rec 2 | DNA internalization-related competence protein ComEC/Rec2 | 2433 | 69108..71540 | ABIBUN_14488 |
| Node_15 | <i>ChpA</i> | Chemotaxis protein histidine kinase | 4521 | 56535..61055 | ABIBUN_15493 |
| Node_15 | <i>pilJ</i> | Methyl-accepting chemotaxis protein | 2079 | 61202..63280 | ABIBUN_15498 |
| Node_15 | <i>pill</i> | Chemotaxis signal transduction protein | 537 | 63327..63863 | ABIBUN_15503 |
| Node_15 | <i>pilH</i> | CheY-like receiver | 363 | 63924..64286 | ABIBUN_15508 |
| Node_15 | <i>pilG</i> | CheY-like receiver | 384 | 64310..64693 | ABIBUN_15513 |
| Node_83 | <i>pilE</i> | Tfp pilus assembly protein | 426 | 119237..119662 | ABIBUN_16998 |
| Node_83 | <i>pilE</i> | Tfp pilus assembly protein | 483 | 119659..120141 | ABIBUN_17003 |

Tabla 2: (Continuación)

| Conting | Gen | Función | pb | Posición | Identificación |
|---------|-----------------------------|--|------|----------------|----------------|
| Node_83 | <i>pilY1</i> | Tfp pilus assembly protein, | 3867 | 120154..124020 | ABIBUN_17008 |
| Node_83 | <i>pilX</i> | Putative type IV fimbrial biogenesis protein | 819 | 124020..124838 | ABIBUN_17013 |
| Node_83 | <i>pilW</i> | prepilin-type N-terminal cleavage/methylation domain protein | 1002 | 124835..125836 | ABIBUN_17018 |
| Node_83 | <i>pilV</i> | type IV pilus modification protein PilV | 555 | 125837..126391 | ABIBUN_17023 |
| Node_83 | <i>fimU</i> | Tfp pilus assembly protein FimT putative type 4 | 474 | 126391..126864 | ABIBUN_17028 |
| Node_83 | <i>PilA</i> | Tfp pilus assembly protein, major pilin PilA | 486 | 134865..135350 | ABIBUN_17073 |
| Node_83 | <i>HofQ</i> <i>/pilQ</i> | Type II secretory pathway, component HofQ | 2166 | 148142..150307 | ABIBUN_17123 |
| Node_83 | <i>pilP</i> | Tfp pilus assembly protein PilP | 528 | 150370..150897 | ABIBUN_17128 |
| Node_83 | <i>pilO</i> | Tfp pilus assembly protein PilO---membrane protein ComO | 741 | 150908..151648 | ABIBUN_17133 |
| Node_83 | <i>pilN</i> | PilN type 4 fimbrial biogenesis protein PilN | 642 | 151645..152286 | ABIBUN_17138 |
| Node_83 | <i>pilM</i> | ATPase PilM--type IV pilus assembly protein PIlM | 1023 | 152286..153308 | ABIBUN_17143 |

Tabla 3: Genes codificantes del sistema de pili tipo I (operón *pap*) en *A. baumannii* 107m

| Conting | Gen | Función | pb | Posición | Identificación |
|---------|-------------|--------------------------------------|------|----------------|----------------|
| Node_5 | <i>fimA</i> | P pilus assembly protein, pilin FimA | 1017 | 265628..266644 | ABIBUN_09715 |

Tabla 3: (Continuación)

| Conting | Gen | Función | pb | Posición | Identificación |
|---------|-------------|--|------|----------------|----------------|
| Node_5 | <i>papC</i> | P pilus assembly protein, porin PapC | 2559 | 266641..269199 | ABIBUN_09720 |
| Node_5 | <i>papD</i> | P pilus assembly protein, chaperone PapD | 735 | 269257..269991 | ABIBUN_09725 |
| Node_5 | <i>fimA</i> | P pilus assembly protein, pilin FimA | 534 | 270080..270613 | ABIBUN_09730 |

Tabla 4: Genes codificantes del sistema de pili tipo I (operón *csu*) en *A. baumannii* 107m

| Conting | Gen | Función | pb | Posición | Identificación |
|---------|---------------|----------------------------------|------|------------|----------------|
| Node_38 | <i>csuA/B</i> | Sigma-fimbriae | 546 | 5896..6432 | Falta |
| Node_38 | <i>csuA</i> | CsuA | 516 | 5273..5821 | Falta |
| Node_38 | <i>csuB</i> | Sigma-fimbriae chaperone protein | 819 | 4749..5267 | Falta |
| Node_38 | <i>csuC</i> | Sigma-fimbriae usher protein | 2496 | 3922..4743 | Falta |
| Node_38 | <i>csuD</i> | Sigma-fimbriae tip adhesion | 1017 | 1427..3925 | Falta |
| Node_38 | <i>csuE</i> | hypothetical protein | 231 | 411..1430 | Falta |

Tabla 5: Gen codificante de sistema de pili tipo III *A. baumannii* 107m

| Conting | Gen | Función | pb | Posición | Identificación |
|--------------|-------------|--|------|-----------|----------------|
| Node 37AN_94 | <i>fiIF</i> | pilus assembly protein FiIF, Uncharacterized conserved protein | 1926 | 895..2820 | ABIBUN_03394 |

Otro gen que se identificó en *A. baumannii* 107m, implicado en la detección de quórum y necesario para la formación de biopelículas, es el *N-acil-L-homoserin lactona sintetasa* (*Abal*). Tabla 6

Tabla 6: Gen codificante de *N-acil-L-homoserin lactona sintetasa* (*Abal*)

| Contig | Gen | Función | pb | Posición | Identificación |
|--------|-------------|--|-----|---------------|----------------|
| Node_9 | <i>Abal</i> | N-acyl-L-homoserine lactone synthetase | 575 | 28309..>28883 | ABIBUN_00770 |

4.2 Genes codificantes involucrados en la biosíntesis de sideróforos

De los tres grupos de genes codificantes de proteínas implicadas en la biosíntesis de sideróforos descritos en estudios previos para la cepas de *A. baumannii* ATCC 19606, ATCC 17978 y 8399, en el genoma de estudio *A. baumannii* 107m, se encontraron dos de estos grupos: El primero, el grupo de genes codificantes del sideróforo acinetobactin compuesto de 18 genes y el segundo, el grupo de genes putativos codificantes de un sideróforo putativo compuesto de 8 genes. También se identificó grupo de genes dentro de los cuales se encuentra el gen *entA*, el cual es necesario para la completa biosíntesis del sideróforo acinetobactin. Ver tablas 7, 8 y 9.

Tabla 7: Genes codificantes del sideróforo acinetobactin en la cepa *A. baumannii* 107m

| Contig | Gen | Función | pb | Posición | Identificación |
|---------|-------------|---|------|------------|----------------|
| Node_22 | <i>basJ</i> | isochorismate synthetase | 1170 | 149..1318 | ABIBUN_13511 |
| Node_22 | <i>basI</i> | putative phosphopantetheinyl transferase | 774 | 1443..2216 | ABIBUN_13516 |
| Node_22 | <i>basH</i> | Predicted thioesterase involved in non-ribosomal peptide biosynthesis | 735 | 2209..2943 | ABIBUN_13521 |

Tabla 7: (Continuación)

| Contig | Gen | Función | pb | Posición | Identificación |
|---------|-----------------------------|---|------|--------------|----------------|
| Node_22 | <i>barB</i> | ABC-type multidrug transport system, ATPase | 1596 | 3015..4610 | ABIBUN_13526 |
| Node_22 | <i>barA</i> | ATPase and permease component of ABC-type transporter involved in cytochrome b biosynthesis | 1611 | 4607..6217 | ABIBUN_13531 |
| Node_22 | | hypothetical protein | 156 | 6210..6365 | ABIBUN_13536 |
| Node_22 | <i>basG</i> | histidine decarboxylase | 1552 | 6463..7614 | ABIBUN_13541 |
| Node_22 | <i>basF</i> | Isochorismatase | 870 | 7731..8600 | ABIBUN_13546 |
| Node_22 | <i>basE</i> <i>/entE</i> | Enterobactin synthase subunit E | 1629 | 8618..10246 | ABIBUN_13551 |
| Node_22 | <i>basD</i> | Non-ribosomal peptide synthetase modules and related proteins | 2940 | 10408..13350 | ABIBUN_13556 |
| Node_22 | <i>basC</i> | Lysine/ornithine N-monooxygenase | 1308 | 13398..14708 | ABIBUN_13561 |
| Node_22 | <i>bauA</i> | Outer membrane receptor proteins, mostly Fe transport | 2274 | 14772..17048 | ABIBUN_13566 |
| Node_22 | <i>bauB</i> | ABC-type enterochelin transport system, periplasmic component | 966 | 17161..18129 | ABIBUN_13571 |
| Node_22 | <i>bauE</i> | ABC-type enterochelin transport system, ATPase component | 768 | 18136..18906 | ABIBUN_13576 |
| Node_22 | <i>bauC</i> | ABC-type enterochelin transport system, permease component | 945 | 18903..19850 | ABIBUN_13581 |
| Node_22 | <i>baud</i> | ABC-type enterochelin transport system | 939 | 19850..20791 | ABIBUN_13586 |

Tabla 7: (Continuación)

| Contig | Gen | Función | pb | Posición | Identificación |
|---------|-------------|---|------|--------------|----------------|
| Node_22 | <i>basB</i> | Non-ribosomal peptide synthetase modules and related proteins | 2091 | 21355..23448 | ABIBUN_13591 |
| Node_22 | <i>basA</i> | Non-ribosomal peptide synthetase modules and related proteins | 1845 | 23519..25366 | ABIBUN_13596 |
| Node_22 | <i>bauF</i> | Siderophore-interacting protein | 858 | 25760..26620 | ABIBUN_13601 |

Tabla 8: Grupo de genes que contienen el gen *entA* necesario para la completa biosíntesis del sideróforo acinetobactin en la cepa *A. baumannii* 107m

| Conting | Gen | Función | pb | Posición | Identificación |
|---------|-------------|---|-----|----------------|----------------|
| Node_5 | <i>modE</i> | N-terminal domain of molybdenum-binding protein putative | 351 | 242069..242419 | ABIBUN_09595 |
| Node_5 | <i>modA</i> | ABC-type molybdate transport system | 786 | 242607..243392 | ABIBUN_09600 |
| Node_5 | <i>modB</i> | ABC-type molybdate transport system, | 693 | 243389..244081 | ABIBUN_09605 |
| Node_5 | <i>modC</i> | ABC-type molybdate transport system | 621 | 244086..244706 | ABIBUN_09610 |
| Node_5 | <i>entA</i> | Putative 2,3-Dihydro-2,3-dihydroxybenzoate dehydrogenase | 771 | 245066..245836 | ABIBUN_09615 |
| Node_5 | <i>entB</i> | Isochorismate hydrolase | 642 | 245909..246550 | ABIBUN_09620 |
| Node_5 | | Fe ²⁺ /Zn ²⁺ uptake regulation proteins | 402 | 247078..247479 | ABIBUN_09625 |

Tabla 9: Grupo de genes codificantes de un sideróforo putativo en *A. baumannii* 107m

| Conting | Gen | Función | Pb | Posición | Identificación |
|---------|------------------|--|------|----------------|----------------|
| Node_5 | <i>iucA</i> | Putative siderophore biosynthesis protein | 1785 | 119480..121264 | ABIBUN_09000 |
| Node_5 | <i>iucD</i> | Lysine/ornithine N-Monooxygenase | 1434 | 121257..122690 | ABIBUN_09005 |
| Node_5 | <i>iucA_iucC</i> | siderophore synthetase component | 1842 | 124162..126003 | ABIBUN_09015 |
| Node_5 | <i>iucA_iucC</i> | Siderophore synthetase component | 1911 | 126013..127923 | ABIBUN_09020 |
| Node_5 | | hypothetical protein | 630 | 128077..128706 | ABIBUN_09025 |
| Node_5 | <i>menG</i> | Demethylmenaquinone methyltransferase | 618 | 128693..129310 | ABIBUN_09030 |
| Node_5 | <i>tonB</i> | ferric aerobactin receptor precursor (Cloacin receptor) | 2319 | 129395..131713 | ABIBUN_09035 |
| Node_5 | <i>pepSY</i> | Uncharacterized iron-regulated membrane PepSY-associated TM helix family protein | 1524 | 132092..133615 | ABIBUN_09045 |

También se encontraron 28 genes en la cepa de estudio asociados a la captación de hierro, almacenamiento y transporte del hierro en diferentes posiciones del genoma. Ver tabla 10.

Tabla 10: Genes codificantes de receptores de sideróforos en *A. baumannii* 107m

| Conting | Gen | Función | pb | Posición | Identificación |
|--------------|-------------|--|------|----------------|----------------|
| Node_12 5 | <i>fepA</i> | Outer membrane receptor for ferrienterochelin and colicins | 2265 | 144108..146372 | ABIBUN_05517 |
| Node_83 | <i>Bfr</i> | Bacterioferritin iron storage and mobility | 195 | 132115..132309 | ABIBUN_17058 |
| Node_83 | <i>Bfr</i> | Bacterioferritin (cytochrome b1) | 465 | 132555..133019 | ABIBUN_17063 |
| Node_23 | <i>tonB</i> | hypothetical protein-Periplasmic protein TonB, links inner and outer membranes | 885 | 12041..12925 | ABIBUN_16306 |
| Node_15 | <i>tonB</i> | Outer membrane receptor proteins, mostly Fe transport | 2205 | 78617..80821 | ABIBUN_15583 |

Tabla 10: (Continuación)

| Nodo | Gen | Función | Pb | Posición | Identificación |
|-------------|---------------------------|---|-----------|-----------------|-----------------------|
| 15 | | Outer membrane receptor proteins, mostly Fe transport | 2058 | 146653..148710 | ABIBUN_15888 |
| 1 | | Outer membrane receptor proteins, mostly Fe transport | 2265 | 126931..129198 | ABIBUN_11980 |
| 5 | (<i>EXBD</i> -like) | biopolymer transport protein | 414 | 73470..73883 | ABIBUN_08785 |
| 5 | <i>ExbD</i> / <i>toIR</i> | biopolymer transport protein | 423 | 73903..74325 | ABIBUN_08790 |
| 5 | | biopolymer transport protein | 882 | 74341..75222 | ABIBUN_08795 |
| 5 | <i>tonB</i> | Periplasmic protein TonB, links inner and outer membranes | 717 | 75263..75979 | ABIBUN_08800 |
| 5 | <i>tonB</i> | Outer membrane receptor proteins, mostly Fe transport | 2601 | 76088..78688 | ABIBUN_08805 |
| 5 | <i>putative tonB</i> | Periplasmic protein TonB, links inner and outer membranes | 828 | 300788..301615 | ABIBUN_09860 |
| 5 | <i>ExbB</i> -like | Biopolymer transport proteins | 735 | 301640..302374 | ABIBUN_09865 |
| 5 | <i>ExbD</i> -like | putative biopolymer transport protein | 405 | 302374..302778 | ABIBUN_09870 |
| 5 | | Outer membrane receptor proteins, mostly Fe transport | 2613 | 304710..307322 | ABIBUN_09880 |
| 5 | | Outer membrane receptor proteins, mostly Fe transport putative tonB-dependent receptor protein (outer membrane salicin receptor) | 2331 | 307576..309906 | ABIBUN_09885 |

Tabla 10: (Continuación)

| Nodo | Gen | Función | Pb | Posición | Identificación |
|-------------|---------------------|---|------|----------------|----------------|
| 12 | <i>tonB</i> | Periplasmic protein TonB, links inner and outer membranes | 756 | 189582..190337 | ABIBUN_02362 |
| 12 | <i>ExbB</i> | Biopolymer transport proteins | 621 | 190382..191002 | ABIBUN_02367 |
| 12 | <i>ExbD protein</i> | Biopolymer transport protein | 405 | 191002..191406 | ABIBUN_02372 |
| 123_A_N_151 | <i>tonB</i> | Outer membrane receptor proteins, mostly Fe transport. | 2115 | 75637..77751 | ABIBUN_10820 |
| 125 | <i>tonB</i> | Outer membrane receptor proteins, mostly Fe transport. | 2115 | 227497..229611 | ABIBUN_05927 |

4.3 Genes codificantes para cápsula positiva

En el genoma de *A. baumannii* 107m se encontró un grupo de 6 genes encargados del ensamblaje y polimerización de la cápsula. Ver tabla 11.

Tabla 11: Genes codificantes de polimerización y ensamblaje de cápsula en *A. baumannii* 107m

| Contig | Gen | Función | Pb | Posición | Identificación |
|----------|-----------------|---|------|--------------|----------------|
| Node_1_9 | <i>mvN</i> | Uncharacterized membrane protein, putative virulence factor | 1542 | 20933..22474 | ABIBUN_00410 |
| Node_1_9 | <i>fkpA-fkB</i> | FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerases 1 | 696 | 22520..23215 | ABIBUN_00415 |
| Node_1_9 | <i>fkpA</i> | FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerases 1 | 723 | 23266..23988 | ABIBUN_00420 |

Tabla 11: Continuación

| Contig | Gen | Función | Pb | Posición | Identificación |
|---------|-------------|--|------|--------------|----------------|
| Node_19 | <i>ptK</i> | Uncharacterized protein involved in exopolysaccharide biosynthesis | 2187 | 24182..26368 | ABIBUN_00425 |
| Node_19 | <i>Ptp</i> | Protein-tyrosine-phosphatase | 429 | 26388..26816 | ABIBUN_00430 |
| Node_19 | <i>epsA</i> | Periplasmic protein involved in polysaccharide export | 1101 | 26821..27921 | ABIBUN_00435 |

4.4 Genes codificantes de fosfolipasas

En el genoma de *A. baumannii* 107m se identificaron 2 genes codificantes de fosfolipasa D, dos genes codificantes de fosfolipasas C y un gen codificante de fosfolipasa A. Estos genes se encontraron en diferentes posiciones del genoma. Ver tabla 12

Tabla 12: Genes codificantes proteínas con actividad enzimática en *A. baumannii* 107m

| Conting | Gen | Función | Pb | Posición | Identificación |
|---------------|------------|--|------|----------------|----------------|
| Node_19 | <i>Plc</i> | Phospholipase C | 2169 | 16490..18658 | ABIBUN_00390 |
| Node_1 | <i>Plc</i> | Phospholipase C | 2229 | 88910..91138 | ABIBUN_11815 |
| Node_12 3A | <i>Pla</i> | Outer membrane phospholipase A | 1152 | 71273..72424 | ABIBUN_10810 |
| Node_16 | <i>Pld</i> | Putative phospholipase D protein | 1626 | 3557..5182 | ABIBUN_16124 |
| Node_5 | <i>Pld</i> | phospholipase D Active site motif family protein | 1527 | 258273..259799 | ABIBUN_09685 |

4.5 Otros genes codificantes de proteínas de membrana externa asociados a virulencia en *A. baumannii* 107m

Se encontraron 4 genes asociados a virulencia que hacen parte de la membrana externa, un gen codificante de una *OmpA* (*Omp38*) y 3 genes codificantes de *OmpW*. Ver tabla 13

Tabla 13: Genes codificantes de proteínas de membrana externa en *A. baumannii* 107m

| Conting | Gen | Función | pb | Posición | Identificación |
|-------------------------|-------------|--|------|----------------|----------------|
| Node_15 | | Uncharacterized conserved protein | 159 | 91337..91495 | ABIBUN_15638 |
| Node_15 | <i>ompA</i> | Outer membrane protein and related peptidoglycan-associated (lipo)proteins | 1029 | 91620..92648 | ABIBUN_15643 |
| Node_15 | <i>fimT</i> | Tfp pilus assembly protein FimT | 516 | 93029..93544 | ABIBUN_15648 |
| Node_12 | <i>ompW</i> | Outer membrane protein W | 582 | 16896..17477 | ABIBUN_01587 |
| Node_12 8_A_N_1 0 | <i>ompW</i> | Outer membrane protein | 1119 | 90813..91931 | ABIBUN_13282 |
| Node_1 | <i>ompW</i> | Outer membrane protein W | 1056 | 118478..119533 | ABIBUN_11940 |

Segundo Objetivo: Comparación de los perfiles de proteínas de la fracción de membrana externa asociadas a factores de virulencia entre las cepas *A. baumannii* 107m y *A. baumannii* ATCC 19606

El análisis del genoma de *A. baumannii* 107m permitió la identificación de 19 genes que codifican para proteínas de membrana externa asociadas con factores de virulencia. (Tabla 14)

Tabla 14: Lista de genes codificantes de proteínas de membrana externa asociadas a factores de virulencia en la cepa *A. baumannii* 107m

| Gen | Nombre |
|-------------|--|
| <i>papC</i> | P pilus assembly protein, porin PapC |
| <i>bauA</i> | Outer membrane receptor proteins, mostly Fe transport--ferric anguibactin receptor precursor (OM2) |
| <i>TonB</i> | ferric aerobactin receptor precursor (Cloacin receptor) Outer membrane receptor proteins, mostly Fe |
| <i>fepA</i> | Outer membrane receptor for ferrienterochelin and colicins |
| | Outer membrane receptor proteins, mostly Fe transport- TonB-dependent copper receptor |
| <i>tonB</i> | Outer membrane receptor proteins, mostly Fe transport- tonB-dependent receptor yncD precursor |
| <i>tonB</i> | Outer membrane receptor proteins, mostly Fe transport |
| <i>tonB</i> | Outer membrane receptor proteins, mostly Fe transport putative tonB-dependent receptor protein (outer membrane salicin receptor) |
| <i>tonB</i> | Outer membrane receptor proteins, mostly Fe transport TonB-dependent siderophore receptor family protein |
| <i>epsA</i> | Periplasmic protein involved in polysaccharide export putative outer membrane protein |
| <i>piA</i> | Outer membrane phospholipase A |
| <i>ompA</i> | Outer membrane protein and related peptidoglycan-associated (lipo)proteins |
| <i>ompW</i> | Outer membrane protein W |
| <i>ompW</i> | Outer membrane protein W- hypothetical protein |
| <i>ompW</i> | Outer membrane protein W |
| <i>como</i> | Tfp pilus assembly protein <i>PilO</i> ---membrane protein <i>ComO</i> |
| <i>pilQ</i> | Type II secretory pathway, component HofQ |
| <i>pilA</i> | Tfp pilus assembly protein, major pilin <i>PilA</i> fimbrial protein— <i>pilA</i> |
| <i>pilP</i> | Tfp pilus assembly protein <i>PilP</i> |

Los resultados obtenidos al comparar las proteínas de membrana externa asociadas a factores de virulencia, entre las cepas *A. baumannii* 107m y ATCC 19606, utilizando geles bidimensionales, permitieron clasificar los *spots* diferencialmente expresados de cada cepa.

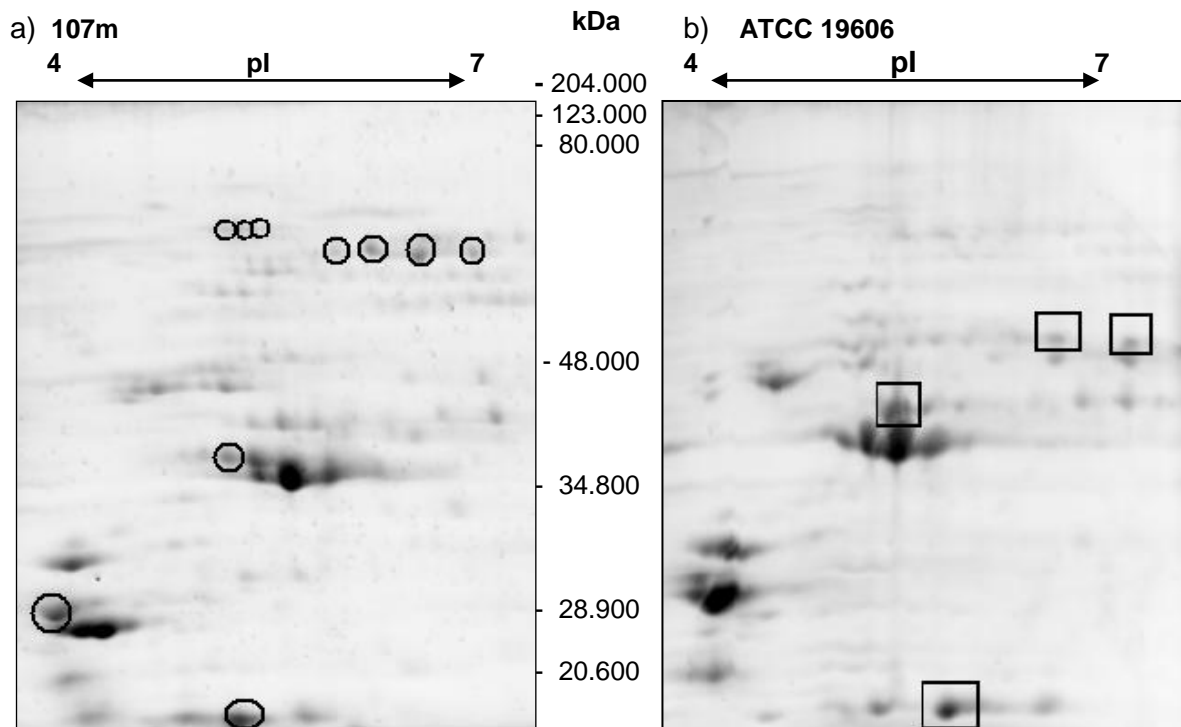
Tomando en consideración esto, se seleccionaron 10 *spots* que fueron identificados por el método mapeo peptídico.

4.6 Análisis de las proteínas diferencialmente expresadas en los geles bidimensionales

Dentro de los perfiles proteómicos de membrana externa de las dos cepas se evidenciaron 73 *spots* para la cepa *A. baumannii* 107m y 65 *spots* para la cepa *A. baumannii* ATCC 19606.

Con el fin de comparar las proteínas expresadas en las dos cepas, se llevaron a cabo sets de análisis cualitativos y cuantitativos a través del software PDQuest. Los análisis permitieron identificar 10 *spots* diferencialmente expresados (con una expresión de +/- 2) para la cepa *A. baumannii* 107m y 4 *spots* diferencialmente expresados para cepa *A. baumannii* ATCC 19606. (Figura 3)

Figura 3: Electroforesis bidimensional de proteínas de membrana externa de *A. baumannii* 107m y *A. baumannii* ATCC 19606



*a) *Spots* diferencialmente expresados (mayor intensidad) en la cepa *A. baumannii* 107m señalados con círculos b) *Spots* diferencialmente expresados (con mayor intensidad) en la cepa *A. baumannii* ATCC 19606 señalados con cuadrados.

4.7 Análisis, por espectrometría de masas, de las proteínas diferencialmente expresadas (con mayor intensidad)

Se seleccionaron 10 *spots* entre las dos cepas de acuerdo a un análisis previo de los puntos isoelectricos y masas moleculares de las proteínas asociadas a virulencia para ser analizados por espectrometría de masas, de los cuales fue posible identificar 8 proteínas. 6 diferencialmente expresadas en *A. baumannii* 107m y 1 diferencialmente expresada en la cepa *A. baumannii* ATCC 19606. (Figura 4) También se identificó 1 proteína de la cepa *A. baumannii* 107m asociada posiblemente a virulencia y que se encontró presente en las dos cepas de estudio con igual intensidad (Figura 5).

A continuación, se presenta en la tabla 15 la información obtenida por el software Mascot, el cual utiliza una puntuación basada en la probabilidad. Mascot recurre a una notación usualmente utilizada en la búsqueda por homología que consiste en proporcionar el valor de $-10 * \log_{10}(P)$, donde P es la probabilidad absoluta. Una probabilidad de 10^{-20} se convierte así en una puntuación de 200. Un umbral comúnmente aceptado, es que un evento es significativo, si se produce al azar con una frecuencia menor al 5%. Las puntuaciones superiores a 67 son significativas ($p < 0,05$). Se resalta que para todos los *spots* analizados por masas, el *score* fue mayor a 85, por ende la identificación de las proteínas obtuvo puntajes mayores que el umbral aceptado ($p < 0.05$). (http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=SQ).

En la tabla 15, se observa una variación en los pesos y en los puntos isoelectricos entre los datos obtenidos experimentalmente (Electroforesis bidimensional) y los datos teóricos dados por la espectrometría de masas en la identificación de las proteínas. Esto se podría explicar porque estos valores dependen de las características de los espectrómetros de masas en términos de poder de resolución, sensibilidad y exactitud en la medida de la masa; del tipo de instrumento; del método de ionización y del tipo de aplicación que se le realice a la muestra a analizar. De igual manera, también puede influir que los geles 2-D no corran de igual manera y que algunos factores químicos influyan en la corrida. (Martin & Ballesteros, 2010)

Tabla 15: Información de las proteínas identificadas por espectrometría de masas, mediante MALDI TOF-TOF (mapeo péptidico)¹

| Spot | Proteína identificada | M _(w) exp. | M _(w) Teórica | pI exp. | pI teórico | Score/ % DE COBERTURA | Función |
|-------------------------------|---|--------------------------|-----------------------------|------------|---------------|-----------------------------|--|
| | | (kDa) | (kDa) | (pI) | (pI) | | |
| *4902 | Outer membrane protein W de <i>Acinetobacter baumannii</i> | 79.4 | 21.64 | 4.8 | 5.9 | 137/45 | Transporte de pequeños solutos, receptor para colicinas S4, implicado en la defensa de la bacteria |
| *6802 | TonB-dependent siderophore receptor de <i>Acinetobacter baumannii</i> | 75 | 85.36 | 5.4 | 8.04 | 330/56 | Receptor de sideróforo |
| *6801 | TonB-dependent siderophore receptor de <i>Acinetobacter baumannii</i> | 74 | 85.39 | 5.3 | 7.55 | 491/65 | Receptor de sideróforo |
| *4103 | Outer membrane protein W de <i>Acinetobacter baumannii</i> | 18.6 | 20.08 | 5.0 | 5.09 | 138/53 | Transporte de pequeños solutos, receptor para colicinas S4, implicado en la defensa de la bacteria |
| *2204 | Putative outer membrane protein | 25.5 | 25.58 | 4.4 | 4.47 | 147/72 | Porina, transporte de solutos |
| *3402 | Hypothetical protein ACICU_00960 | 49.7 | 53.06 | 4.9 | 5.2 | 110/34 | |
| **5503-1 (cepa ATCC 19606) | Outer membrane protein A | 44.7 | 36.62 | 5.0 | 5.30 | 88/34 | Apoptosis celular |
| ***5404 | Putative outer membrane protein <i>Omp38</i> , partial | 38 | 29.54 | 5.1 | 7.11 | 519/45 | Apoptosis celular |

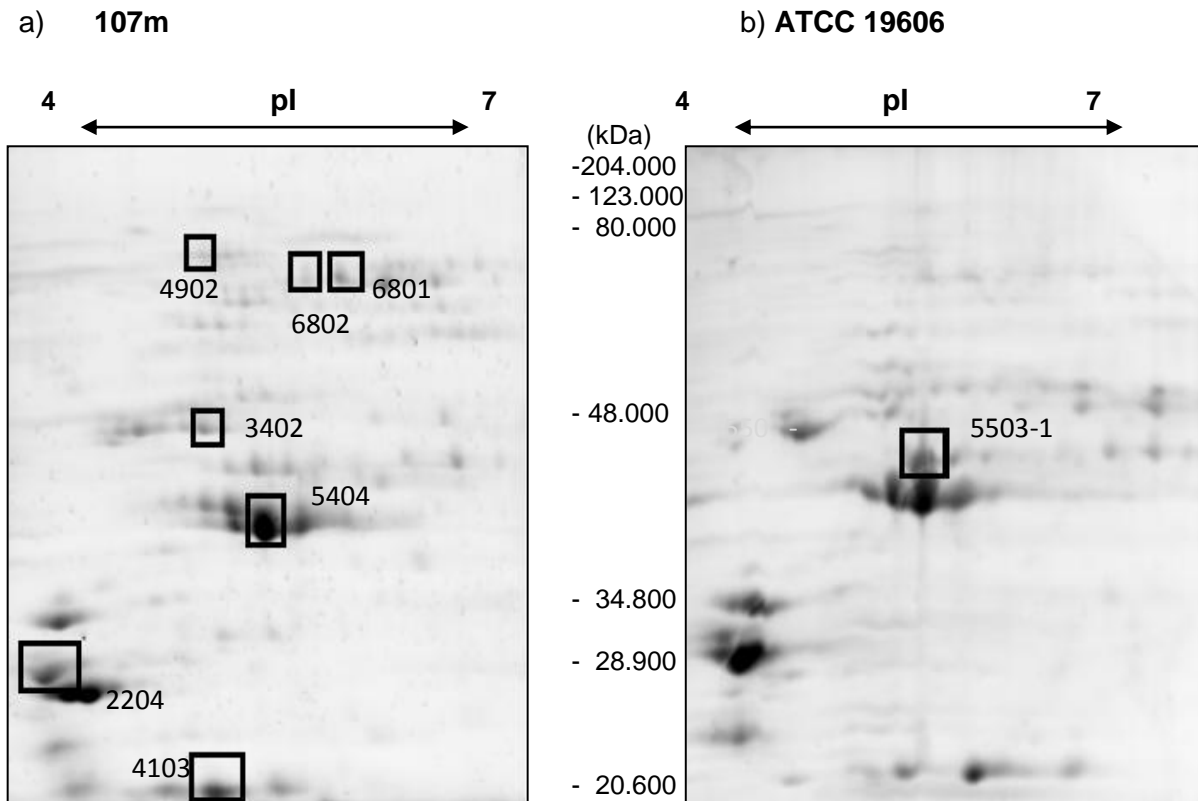
La numeración de los spots es dada por el software PDQuest.

*Proteínas diferencialmente expresadas de la cepa *A. baumannii* 107m

**Proteína diferencialmente expresada de la cepa *A. baumannii* ATCC 19606

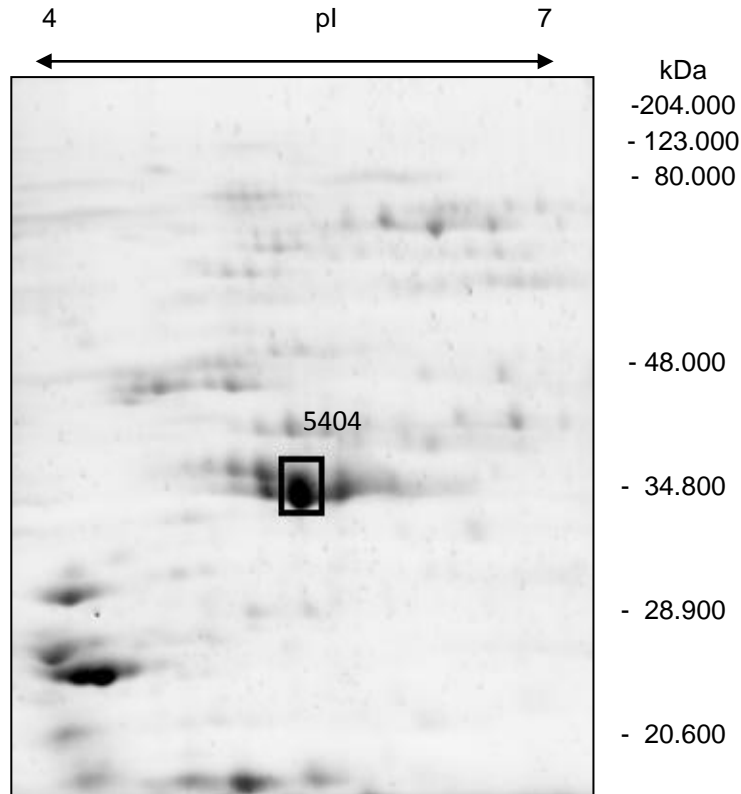
***Proteína de interés asociada a virulencia identificada en *A. baumannii* 107m pero encontrada en las dos cepas de estudio.

Figura 4. *Spots* identificados en la electroforesis bidimensional de proteínas de membrana externa de *A. baumannii* 107m y *A. baumannii* ATCC 19606



* La numeración de los spots es dada por el software PDQuest e indican los *spots* diferencialmente expresados en la cepa de *A. baumannii* 107m y *A. baumannii* ATCC 19606 que fueron identificados por espectrometría de masas. Se exceptúa el *spot* con el número (5404) el cual fue encontrado en las dos cepas bajo el mismo nivel de expresión (en términos de intensidad) asociado posiblemente a virulencia e identificado por espectrometría de masas en *A. baumannii* 107m

Figura 5: Proteína de membrana externa que se presentó bajo el mismo nivel de expresión (intensidad del spot) en las dos cepas de estudio



* Spot encontrado en la cepa *A. baumannii* 107m y *A. baumannii* ATCC 19606 asociado posiblemente a virulencia e identificado por espectrometría de masas en *A. baumannii* 107m

Tercer objetivo: Comparación genómica de los genes codificantes de factores de virulencia encontrados en la cepa de estudio *A. baumannii* 107m

El análisis comparativo de los genes codificantes de factores de virulencia se realizó entre la cepa *A. baumannii* 107m y dos cepas de *A. baumannii* multi-rresistentes (ACICU; AB0057) y dos cepas sensibles (*A. baumannii* ATCC 19606 y *A. baumannii* ATCC 17978) las cuales fueron seleccionadas porque son reportadas con mayor frecuencia en estudios de genómica sobre virulencia y están completamente secuenciadas y anotadas. Las características generales de estas cepas se muestran en la tabla 16.

Tabla 16: Características de las cepas de estudio

| CEPA | CLON | Genbank Accession No. | Origen | Tamaño genoma (Mb) | No de plásmidos |
|--------------------------------------|------|--|--|--------------------------|--------------------|
| <i>A. baumannii</i> 107m | | GenBank GCA_0004 93615.1 | Aislada de sangre en un paciente que se encontraba en el hospital de Colombia en el año 2009 | 3.9 | 1 |
| <i>A. baumannii</i> ACICU | II | RefSeq: NC_01061 1.1 GenBank: CP000863 .1 | Se aisló del líquido cefalorraquídeo de un paciente que se encontraba en UCI en Roma, Italia, en 2005 | 3.90 | 2 |
| <i>A. baumannii</i> AB0057 | I | RefSeq: NC_01158 6.1 GenBank: CP001182 -2 | Es una cepa multi-resistente aislada a partir de una infección del torrente sanguíneo de un paciente en el Walter Reed Army Medical Center en United States of America | 4.05 | 1 |
| <i>A. baumannii</i> ATCC 19606 | | GenBank: ACQB000 00000 | Aislada de una muestra de orina antes de 1949 | 3.97 | |
| <i>A. baumannii</i> ATCC 17978 | | RefSeq: NC_00908 5.1 | Fue aislada de un caso de meningitis y ha sido utilizada para el análisis comparativo con otras especies de <i>Acinetobacter</i> . | 4.0 | 2 |

La ubicación y comparación de los genes codificantes de factores de virulencia se realizó tomando en consideración los siguientes aspectos: porcentaje de identidad de las secuencias de aminoácidos y nucleótidos y la sintenia entre los grupos de genes asociados a virulencia en los genomas de *A. baumannii* anteriormente descritos.

Para la comparación de los genes asociados a virulencia se realizó una búsqueda en la base de datos (Genbank) de la presencia o ausencia de los genes en cada uno de los

genomas seleccionados. Se alinearon cada una de las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos, utilizando el algoritmo de alineamiento Blast.

Para comparar la organización y la ubicación de los genes dentro cada uno de los genomas en estudio, se utilizaron los programas de Mauve, el cual identifica segmentos conservados entre los genomas señalándolos con bloques de colores y se utilizó WebACT, que a través de la visualización *on-line* de las comparaciones mediante el Artemis Comparison Tool (ACT), desarrollado por el Instituto Sanger, permite conocer la sintenia que hay entre los genomas.

4.8 Genes codificantes de sistemas de adherencia y motilidad

Los grupos de genes correspondientes a los sistemas de pili tipo I (operón *pap* y operón *csu*) identificados en *A. baumannii* 107m, se encontraron con la misma organización genómica en todas las cepas utilizados en el estudio. (Figuras 6 y 7). Sin embargo, los genes identificados alrededor de los operones *csu* y *pap* en *A. baumannii* 107m solamente fueron iguales a los de la cepa *A. baumannii* ACICU.

Figura 6. Sintenia de los genes codificantes del sistema de pili tipo I (operón *pap*) entre cepas de *A. baumannii*

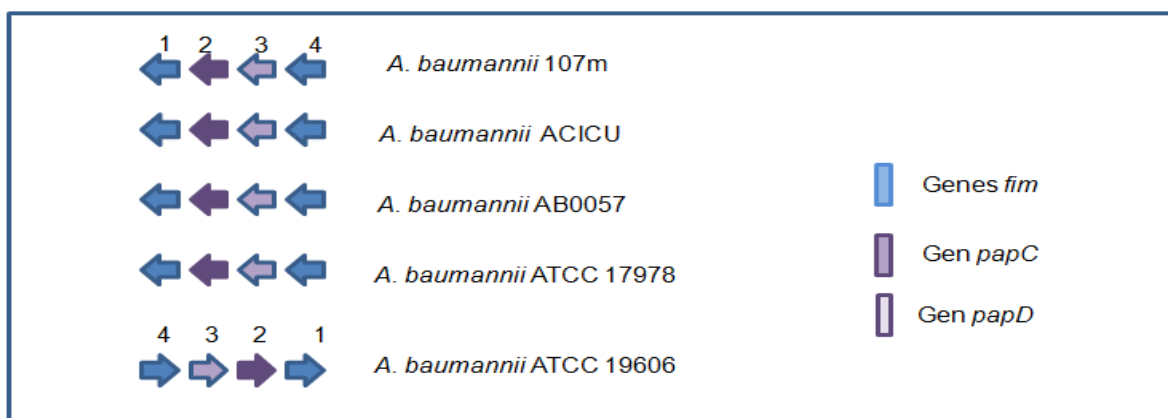
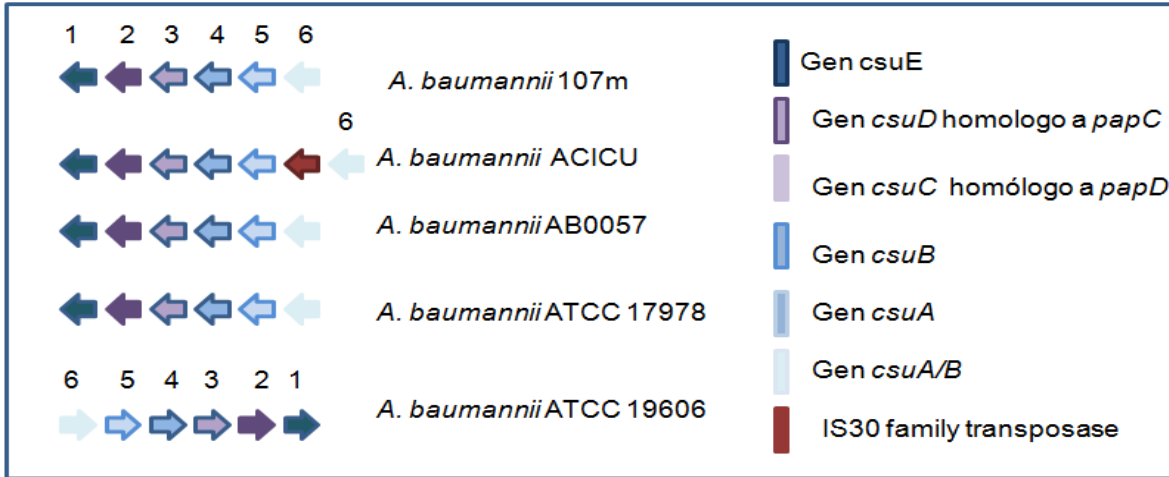
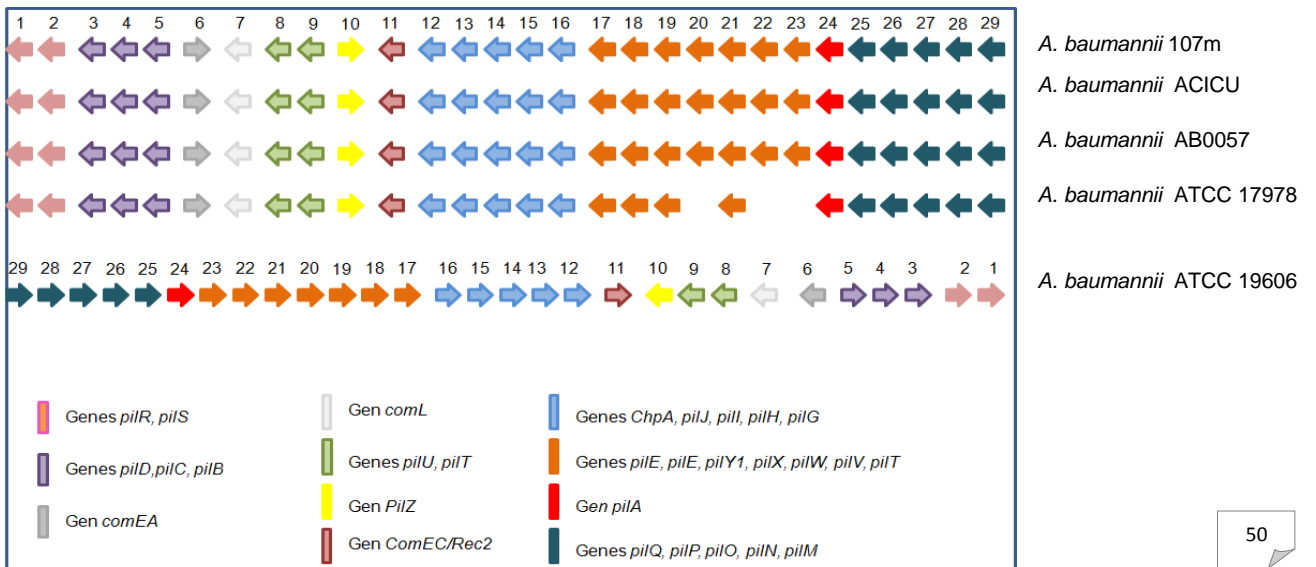


Figura 7. Sintenia de los genes codificantes del sistema de pili tipo I (operón *csu*) entre cepas de *A. baumannii*



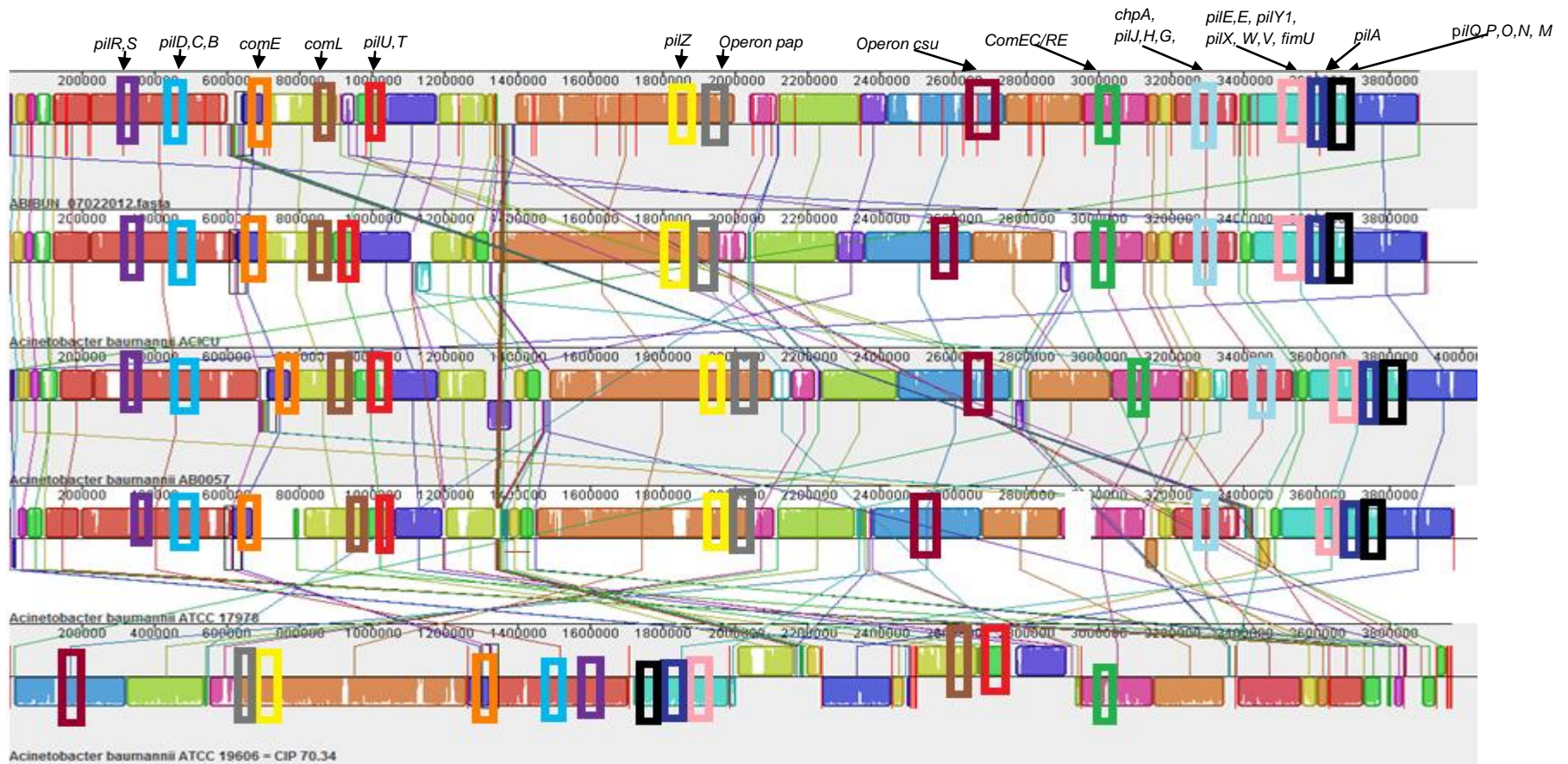
Los genes codificantes del sistema de pili tipo IV identificados en *A. baumannii* 107m, varían en la organización genómica con respecto a la cepa *A. baumannii* ATCC 17978 en que en esta, no se encontraron los genes *pilX pilV* y *pilT* y respecto a la cepa AB0057 la cual carece del gen *ComEC/Rec2* . (Anexo G, Figuras 8). Al revisar los genes que se encuentran alrededor de cada uno de los grupos de genes que conforman el sistema de pili tipo IV en *A. baumannii* 107m, se encontró que los genes identificados en esta cepa, también están ubicados en la misma posición en todos los genomas utilizados en la comparación.

Figura 8. Sintenia de los genes codificantes del sistema de pili tipo IV entre cepas de *A. baumannii*



La posición del operón *pap*, del operón *csu* y de los operones que conforman el sistema de pili tipo IV, se conserva entre la cepa *A. baumannii* 107m y las cepas *A. baumannii* ACICU, AB0057 y ATCC 17978; pero varía con respecto a la cepa *A. baumannii* ATCC 19606. En la Figura 9, se pueden observar los operones que contienen los genes que hacen parte de los sistemas de pili tipo I y IV y su ubicación en los genomas de estudio.

Figura 9. Comparación de la ubicación de los genes que hacen parte de los sistemas de pili tipo I y IV entre las cepas de *A. baumannii* 107m, *A. baumannii* ACICU, *A. baumannii* AB0057, *A. baumannii* ATCC 17978 y *A. baumannii* ATCC 19606



* Resultados de la comparación genómica entre cepas de *A. baumannii* utilizando la herramienta Mauve. En la primera línea de arriba hacia abajo, se encuentra *A. baumannii* 107m seguido de *A. baumannii* ACICU, AB0057, ATCC 17978 y en la última línea esta *A. baumannii* ATCC 19606. Las barras verticales indican el nivel de conservación. Los recuadros resaltados con diferentes colores representan la ubicación de los genes que hacen parte de los sistemas de pili tipo I y IV.

4.9 Genes codificantes de proteínas encargadas de la biosíntesis, transporte y liberación de sideróforos

Los tres grupos de genes relacionados con la biosíntesis de sideróforos, el grupo de acinetobactin, el grupo que contiene el gen *entA* necesario la completa biosíntesis de este sideróforo y el grupo de genes putativos encargados de la biosíntesis de un sideróforo putativo, se encontraron en el genoma de *A. baumannii* 107m organizados de igual manera que la identificada en los genomas ACICU, AB0057, ATCC 19606. Sin embargo, en comparación con la cepa ATCC 17978 se identificaron algunos genes adicionales dentro del grupo de genes de acinetobactin y no se encontró el grupo de genes que contiene el gen *entA*. (Anexo G y Figuras 10,11 y 12)

Figura 10: Sintenia de los genes codificantes del sideróforo acinetobactin entre cepas de *A. baumannii*

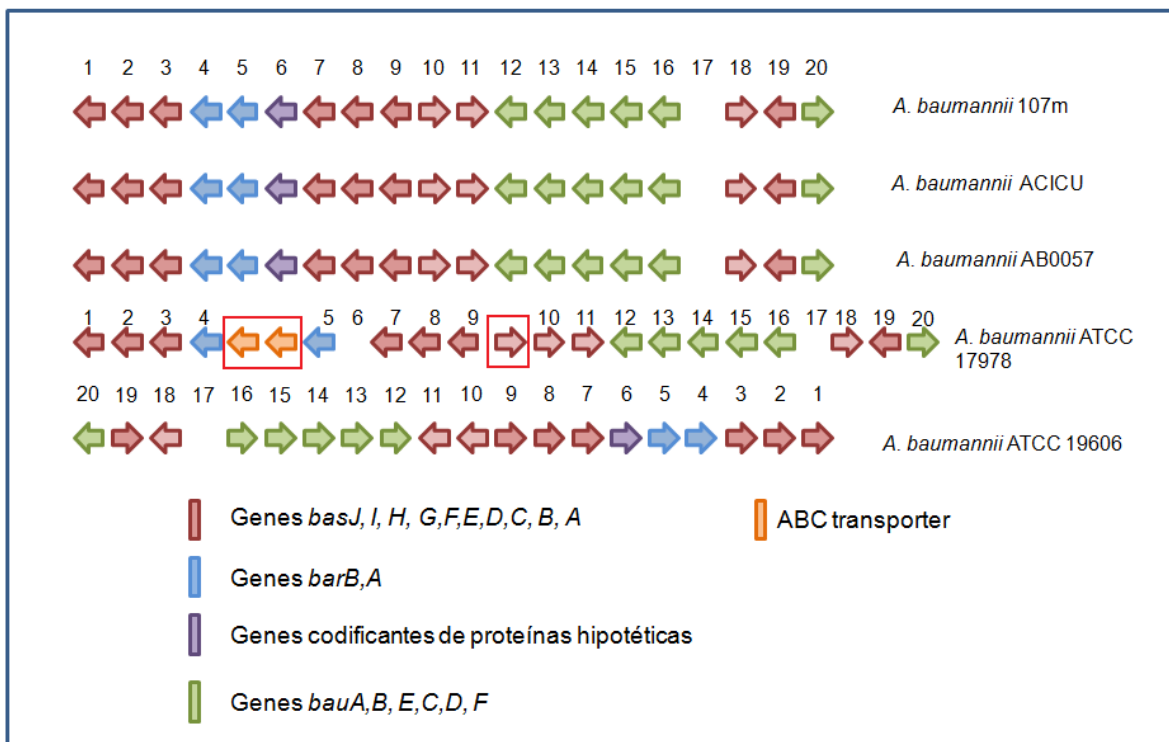


Figura 11: Sintenia de los genes codificantes que contienen el gen *entA* necesario para la completa biosíntesis del sideróforo acinetobactin entre cepas de *A. baumannii*

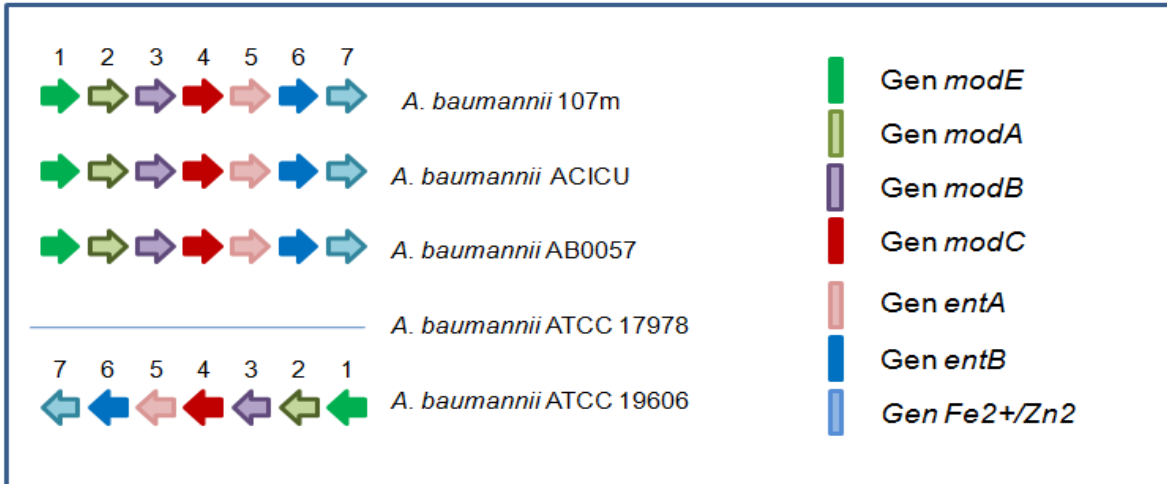
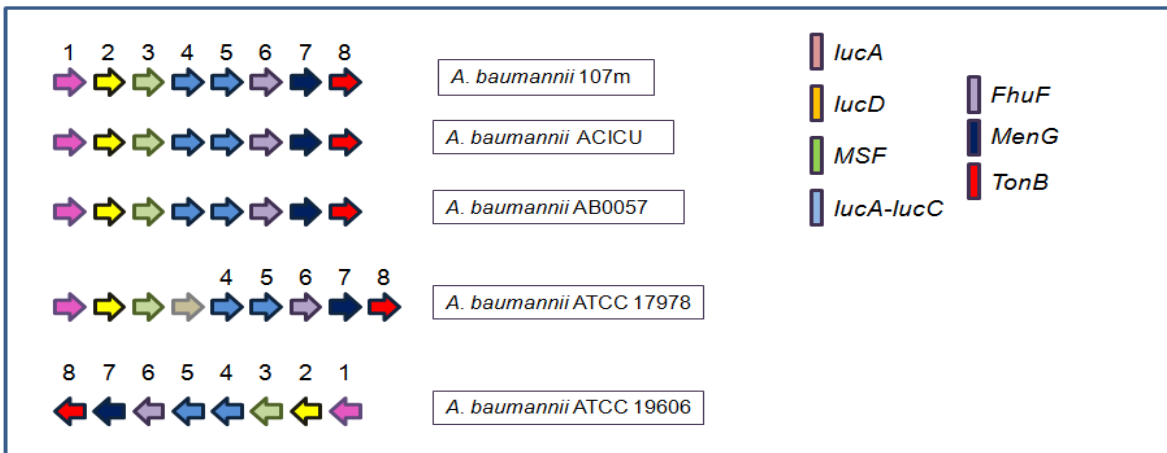
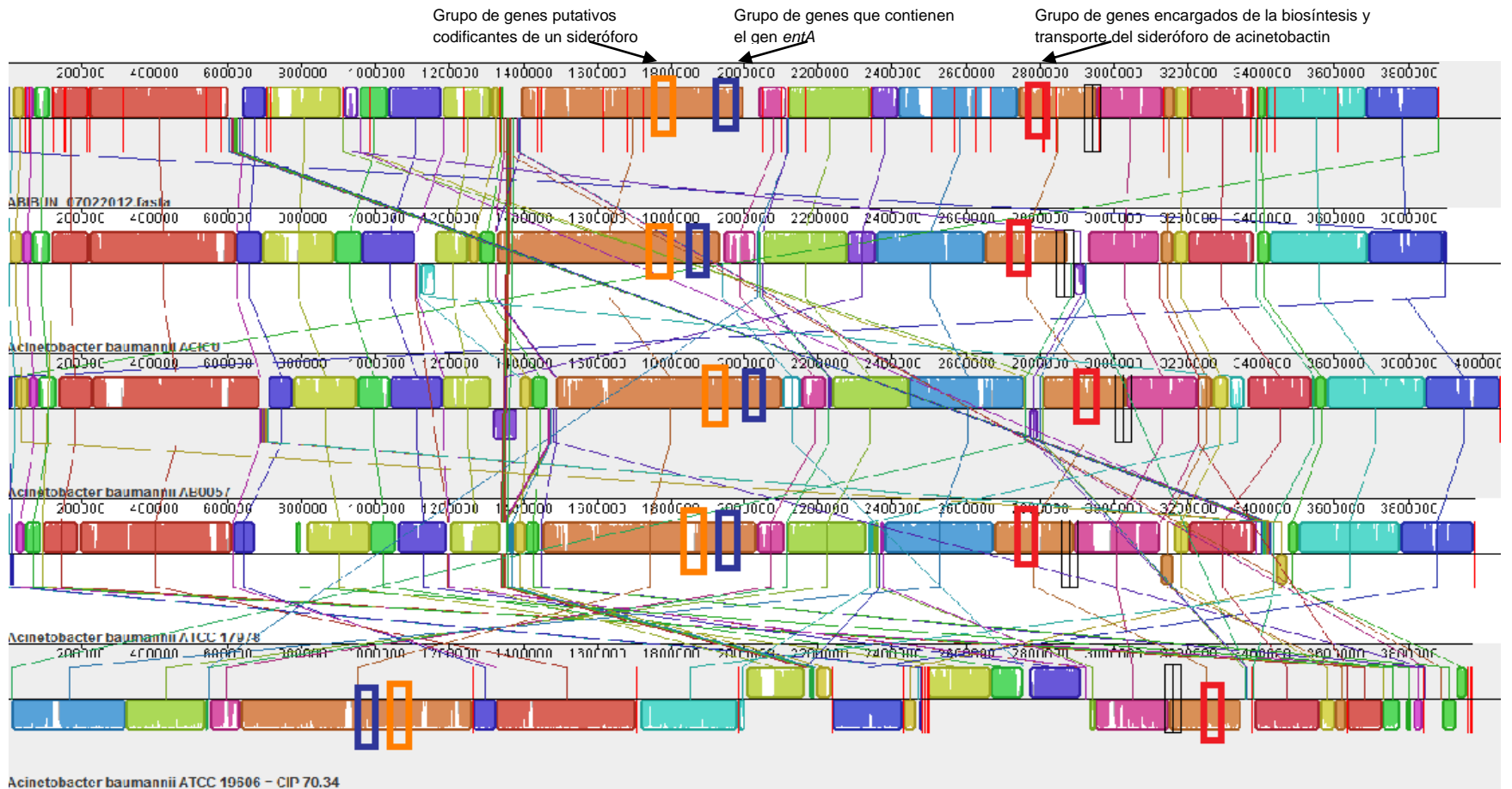


Figura 12: Sintenia de los genes putativos codificantes del sideróforo putativo entre cepas de *A. baumannii*



Los grupos de genes necesarios para la biosíntesis de sideróforos conservan la misma posición en la cepa *A. baumannii* 107m y en las cepas *A. baumannii* ACICU, AB0057 y 17978. Solamente varía con respecto a la cepa *A. baumannii* ATCC 19606. En la figura 13, se pueden observar los operones que contienen los genes encargados de la biosíntesis de sideróforos y su ubicación, resaltando los operones con recuadros de diferentes colores en los 5 genomas de estudio

Figura 13: Comparación de la ubicación de los genes necesarios para la biosíntesis y transporte de sideróforos entre las cepas de *A. baumannii* 107m, *A. baumannii* ACICU, *A. baumannii* AB0057, *A. baumannii* ATCC 17978 y *A. baumannii* ATCC 19606



* Resultados de la comparación genómica entre cepas de *A. baumannii* utilizando la herramienta Mauve. En la primera línea de arriba hacia abajo, se encuentra *A. baumannii* 107m seguido de *A. baumannii* ACICU, AB0057, ATCC 17978 y en la última línea esta *A. baumannii* ATCC 19606. Las barras verticales indican el nivel de conservación. Los recuadros resaltados con diferentes colores representan la ubicación de los genes encargados de la biosíntesis y transporte de sideróforos.

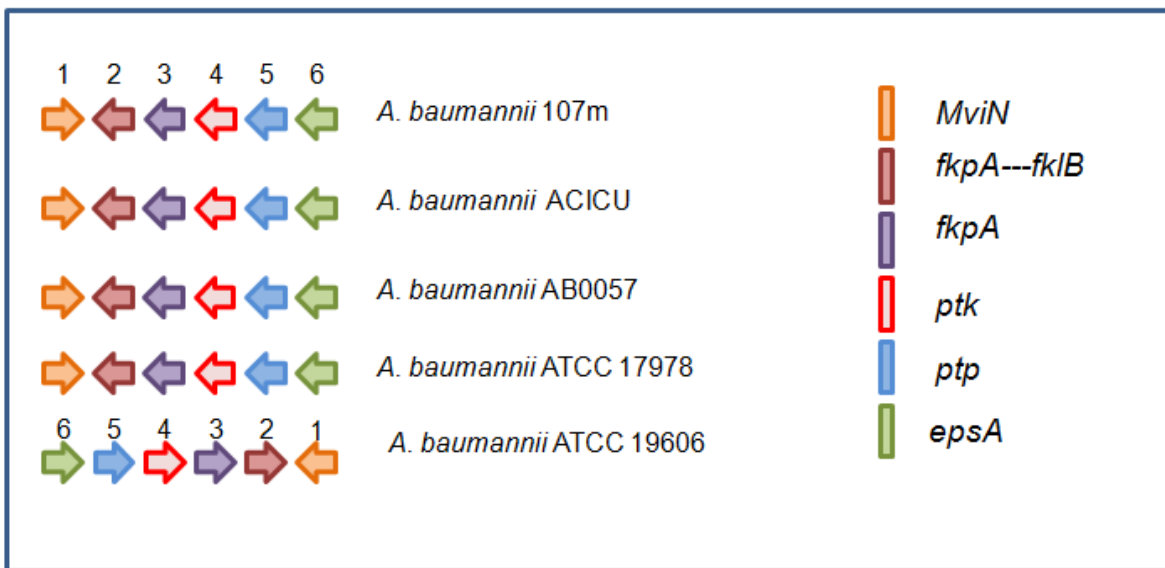
4.10 Genes codificantes de receptores de hierro

Se identificaron 13 receptores *TonB* distribuidos en todo el genoma de *A. baumannii* 107m. De estos receptores 11 fueron encontrados en las cepas de *A. baumannii* ACICU, AB0057, ATCC 19606 y ATCC 17978. Dos receptores *TonB*, solamente fueron identificados en el genoma de estudio (Anexo G).

4.11 Genes codificantes para cápsula positiva

El grupo de genes identificados en *A. baumannii* 107m, necesarios para el ensamblaje y polimerización de la cápsula, se encontraron con la misma organización en todas las cepas de *A. baumannii* ACICU, AB0057, ATCC 17978 y ATCC19606. (Anexo G y Figura 14)

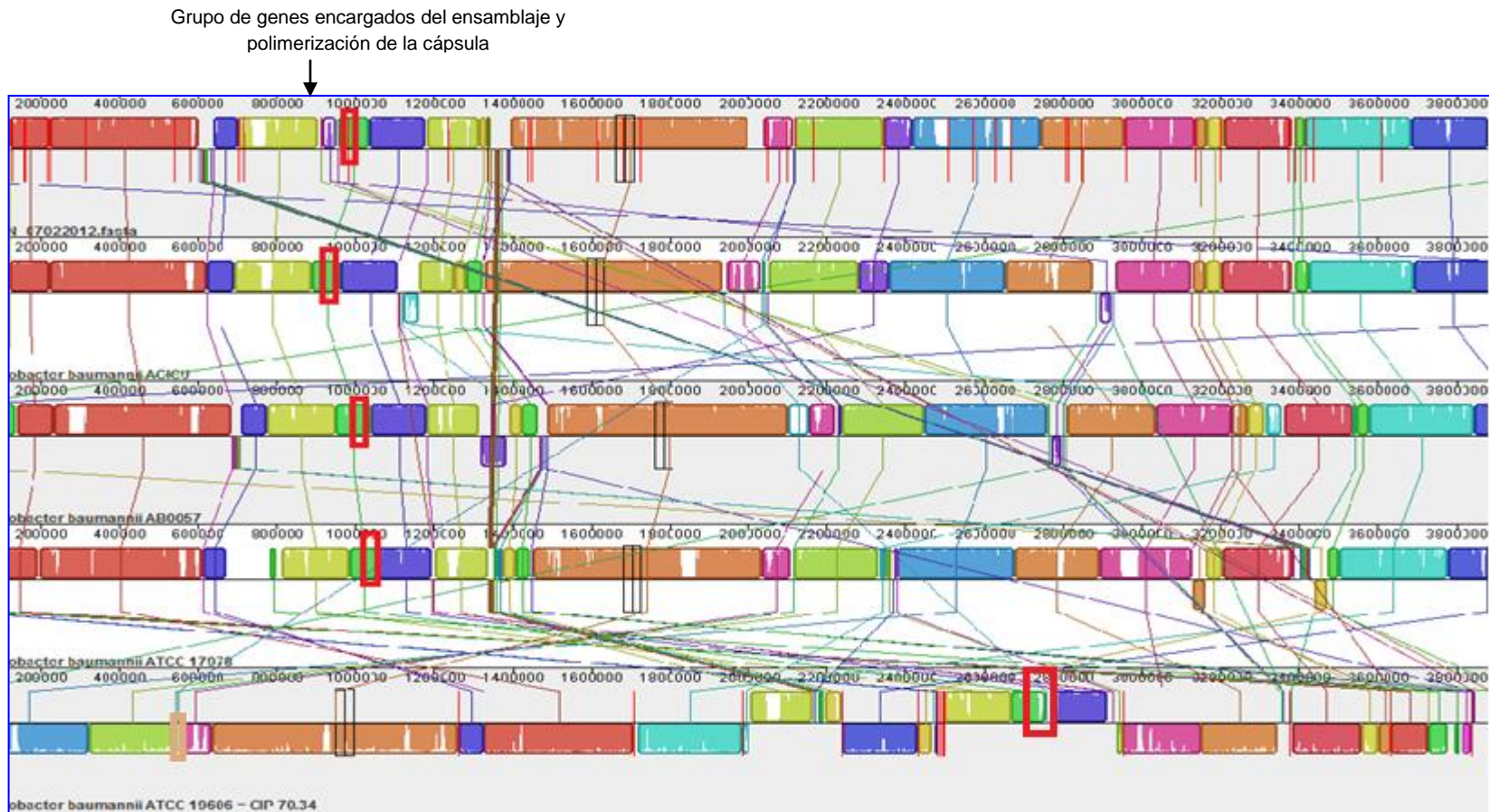
Figura 14: Sintenia de los genes codificantes del ensamblaje y polimerización de la cápsula entre cepas de *A. baumannii*



La posición de los grupos de genes necesarios para el ensamblaje y polimerización de la cápsula conservan la misma posición en la cepa *A. baumannii* 107m y en las cepas *A. baumannii* ACICU, AB0057 y 17978. Solamente varía con respecto a la cepa *A. baumannii* ATCC 19606. En la figura 15 se puede observar la ubicación de este grupo de

genes el cual está resaltado con un recuadro de color rojo en todos los genomas estudiados.

Figura 15: Comparación de la ubicación de los genes necesarios para el ensamblaje y polimerización entre las cepas de *A. baumannii* 107m, *A. baumannii* ACICU, *A. baumannii* AB0057, *A. baumannii* ATCC 17978 y *A. baumannii* ATCC 19606



* Resultados de la comparación genómica entre cepas de *A. baumannii* utilizando la herramienta Mauve. En la primera línea de arriba hacia abajo, se encuentra *A. baumannii* 107m seguido de *A. baumannii* ACICU, AB0057, ATCC 17978 y en la última línea esta *A. baumannii* ATCC 19606. Las barras verticales indican el nivel de conservación. Los recuadros resaltados con color rojo representan la ubicación de los genes encargados del ensamblaje y polimerización de la cápsula.

4.12 Genes codificantes de fosfolipasas

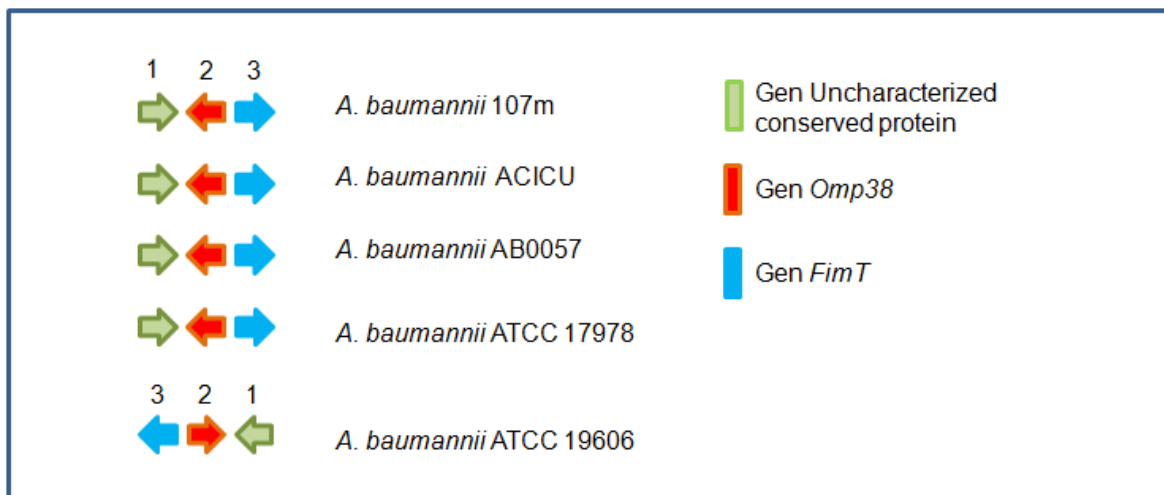
De las 5 fosfolipasas identificadas en el genoma de *A. baumannii* 107m, las fosfolipasas C y A se encontraron en todos los genomas utilizados en la comparación, y al igual que en la cepa de estudio se encontraron distribuidos en diferentes posiciones de los genomas. (Anexo G)

4.13 Genes codificantes de proteínas de membrana externa asociadas a virulencia

En el genoma de *A. baumannii* 107m se identificaron tres genes codificantes de *OmpW* en diferentes posiciones del genoma. En los genomas de ACICU, AB0057, ATCC19606 y ATCC 17978, también se encontraron tres copias de genes codificantes de *OmpW* distribuidos en el genoma.

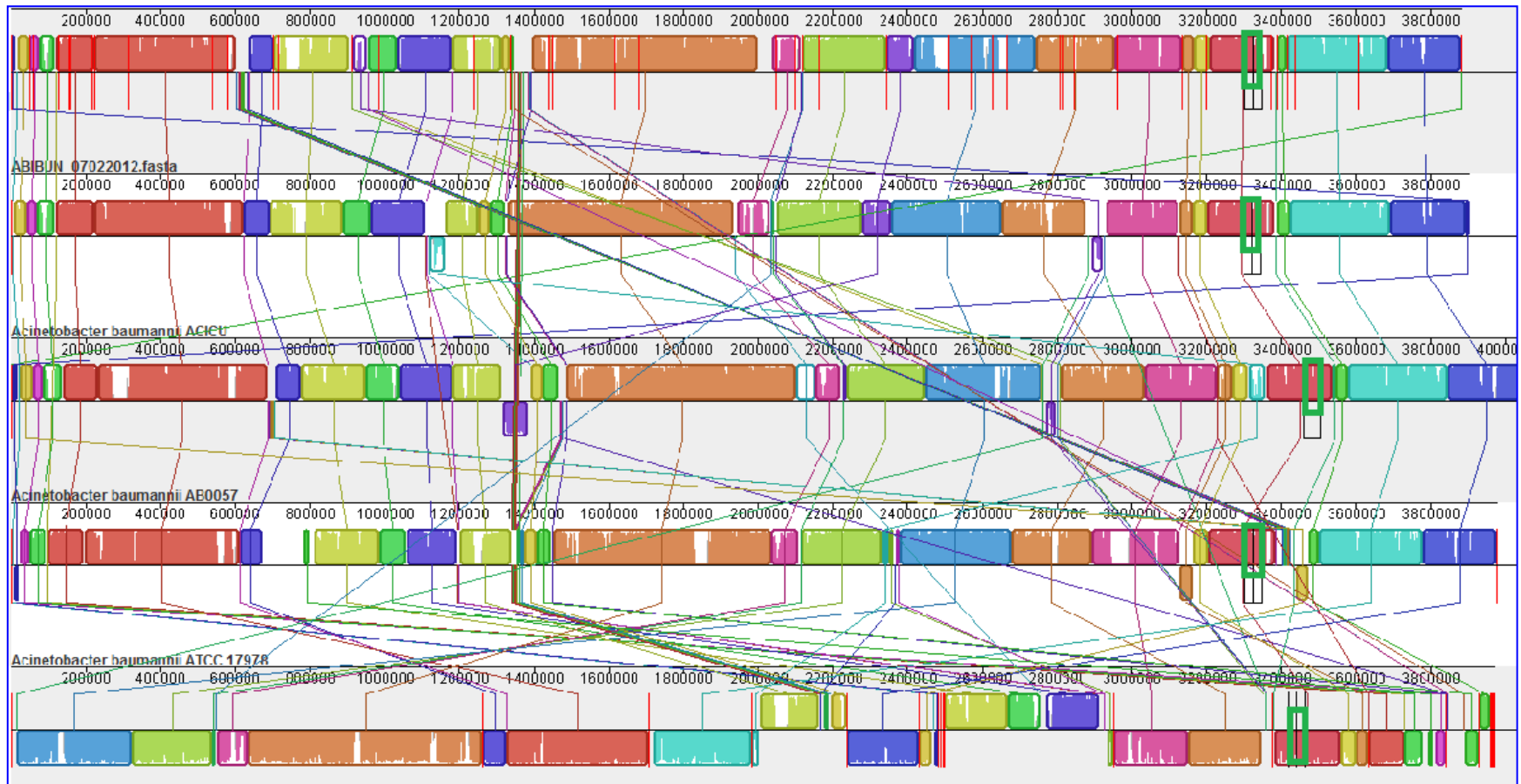
La *OmpA* (*Omp38*), se encontró en el genoma de *A. baumannii* 107m, dentro de un grupo de tres genes. En los genomas ACICU, AB0057, ATCC 19606 se encontró la misma organización que en la cepa de estudio. (Anexo G, Figura 16)

Figura 16. Sintenia del *cluster* de genes que contienen el gen *Omp38* en cepas de *A. baumannii*



El grupo de genes que contiene el gen *OmpA* conservan la misma posición en la cepa *A. baumannii* 107m y en las cepas *A. baumannii* ACICU, AB0057 y 17978. Solamente varía con respecto a la cepa *A. baumannii* ATCC 19606. En la figura 17 se puede observar la ubicación resaltada con un recuadro de color verde en todos los genomas de estudio, este grupo de genes.

Figura 17: Comparación de la ubicación de los genes que contiene el gen *OmpA* entre las cepas de *A. baumannii* 107m, *A. baumannii* ACICU, *A. baumannii* AB0057, *A. baumannii* ATCC 17978 y *A. baumannii* ATCC 19606



* Resultados de la comparación genómica entre cepas de *A. baumannii* utilizando la herramienta Mauve. En la primera línea de arriba hacia abajo, se encuentra *A. baumannii* 107m seguido de *A. baumannii* ACICU, AB0057, ATCC 17978 y en la última línea esta *A. baumannii* ATCC 19606. Las barras verticales indican el nivel de conservación. El recuadro resaltado con color verde representa la ubicación del cluster de genes donde se encuentra el gen *OmpA* (*Omp38*)

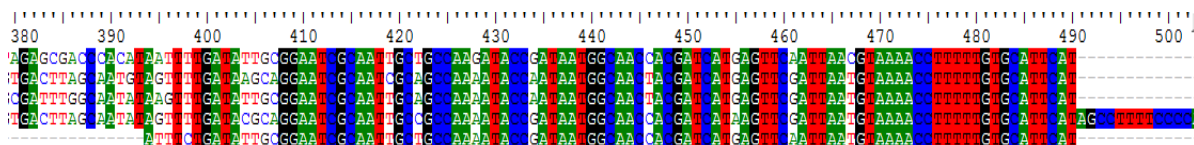
Finalmente al realizar el análisis de cada uno de los genes en cuanto al porcentaje de identidad de los nucleótidos frente a las otras cepas, se encontró que en general los genes comparten entre 95 y 100% de identidad con un cubrimiento del 100%, lo que indica que estos genes son muy similares entre las diferentes especies de *A. baumannii*.

Sin embargo, al comparar la secuencia del gen *pilA*, que hace parte del sistema de pili tipo IV identificado en la cepa *A. baumannii* 107m, se encontró una variación en la longitud de la secuencia de este gen con respecto a las secuencia del mismo gen en las cepas de *A. baumannii* [(ACICU, AB0057, ATCC 19606 y ATCC 17978) (Tabla 17)], esta secuencia comparte una identidad del 97% con un cubrimiento del 19%, es decir que sólo se comparte una fracción de la secuencia con las demás cepas de estudio y la otra parte de la secuencia es específica para *A. baumannii* 107m (Figura 18)

Tabla 17: Tamaño del gen *pilA* encontrado en las cepas de *A. baumannii* 107m, *A. baumannii* ACICU, *A. baumannii* AB0057, *A. baumannii* ATCC 17978 y *A. baumannii* ATCC 19606

| Cepas | Gen <i>pilA</i> | | | | |
|--|-----------------|-------------|-----------|------------------|------------|
| | 107m | ACICU | AB0057 | ATCC 19606 | ATCC 17978 |
| Identificación gen | ABIBUN_17073 | ACICU_03380 | AB57_3634 | HMPREF0010_02528 | A1S_3177 |
| Longitud de la secuencia gen <i>pilA</i> | 486 | 438 | 474 | 477 | 465 |

Figura 18: Alineamiento de secuencias de gen *pilA* de las cepas de *A. baumannii* 107m, *A. baumannii* ACICU, *A. baumannii* AB0057, *A. baumannii* ATCC 17978 y *A. baumannii* ATCC 19606



También se encontró que el tamaño de la secuencia del gen *Omp38* identificado en la cepa *A. baumannii* 107m, varía con respecto a las secuencias de los genomas de *A. baumannii* (ACICU, AB0057, ATCC 19606 y ATCC 17978) compartiendo una identidad del 88% con un cubrimiento del 99% (Tabla 18)

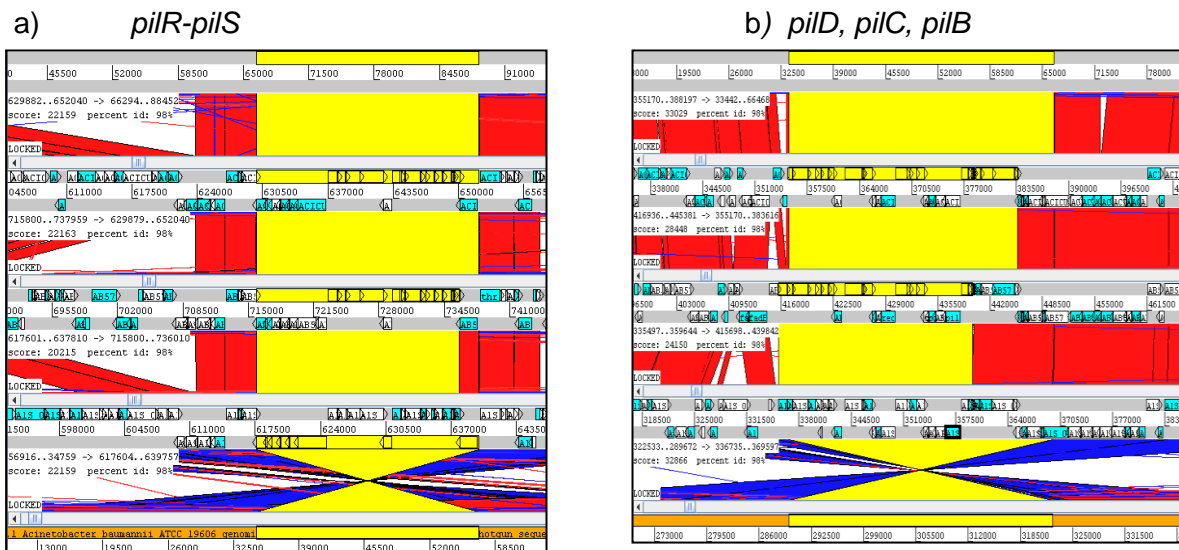
Tabla 18: Tamaño del gen *OmpA* encontrado en las cepas de *A. baumannii* 107m, *A. baumannii* ACICU, *A. baumannii* AB0057, *A. baumannii* ATCC 17978 y *A. baumannii* ATCC 19606

| Cepas | Gen <i>omp38</i> | | | | |
|---|------------------|-------------|-----------|------------------|------------|
| | 107m | ACICU | AB0057 | ATCC 19606 | ATCC 17978 |
| Identificación gen | ABIBUN_15643 | ACICU_03089 | AB57_3344 | HMPREF0010_02782 | A1S_2840 |
| Longitud de la secuencia gen <i>omp38</i> | 1029 | 1071 | 1062 | 1071 | 1041 |

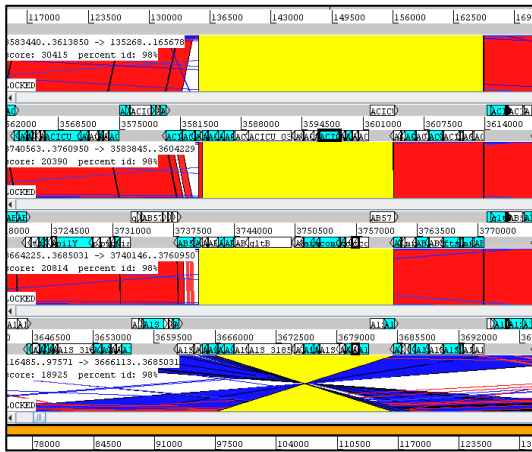
Los resultados de la comparación usando WebACT y la visualización de los mismos, por medio del ACT (Carver *et al.*, 2005), permiten evidenciar que hay una alta similaridad en la organización genómica entre los genomas, lo que se refleja por las barras de color rojo. Estas barras cuando se señalan, se colocan de color amarillo resaltando la conservación de determinado grupo de genes.

A continuación se muestran algunos de los resultados de las imágenes obtenidas a través del WebACT, se presentan por los grupos de genes asociados a virulencia en *A. baumannii* 107m, para tener una mejor visualización de los mismos.

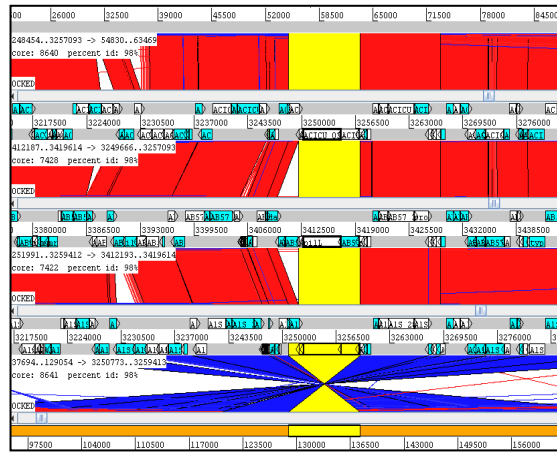
Figura 19: Mapa de sintenia del grupo de genes codificantes de sistema de pili tipo IV



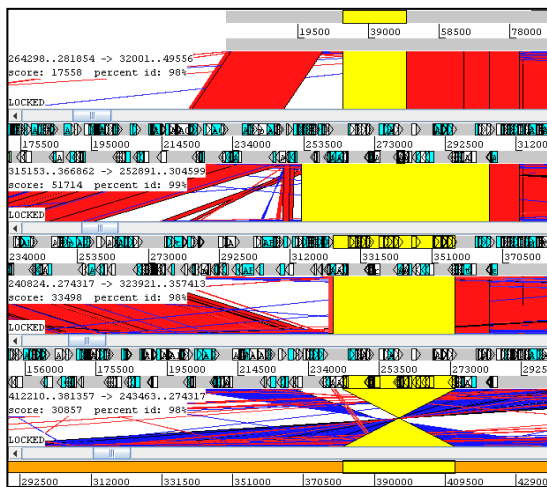
c) *hofQ, pilP, pilO, pilN, pilM*



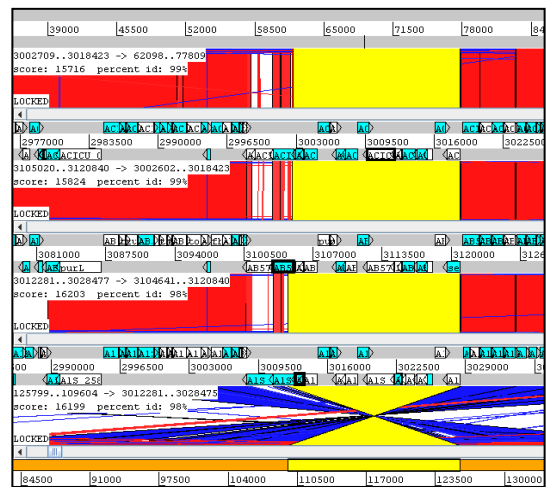
d) *ChpA, pilJ, pill, pilH, pilG*



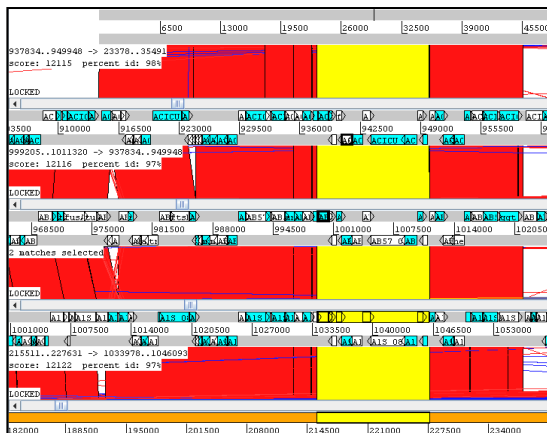
e) *ComEA*



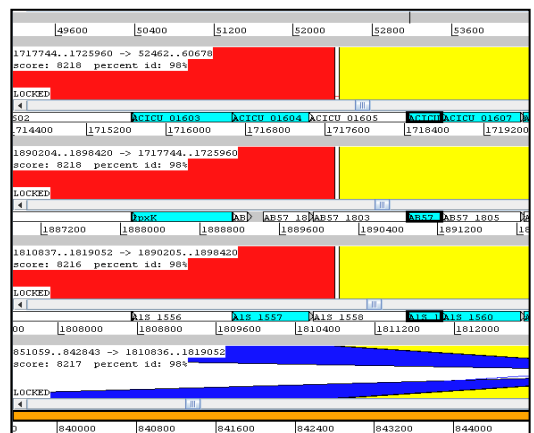
f) *ComE/C*



g) *pilU, pilT*

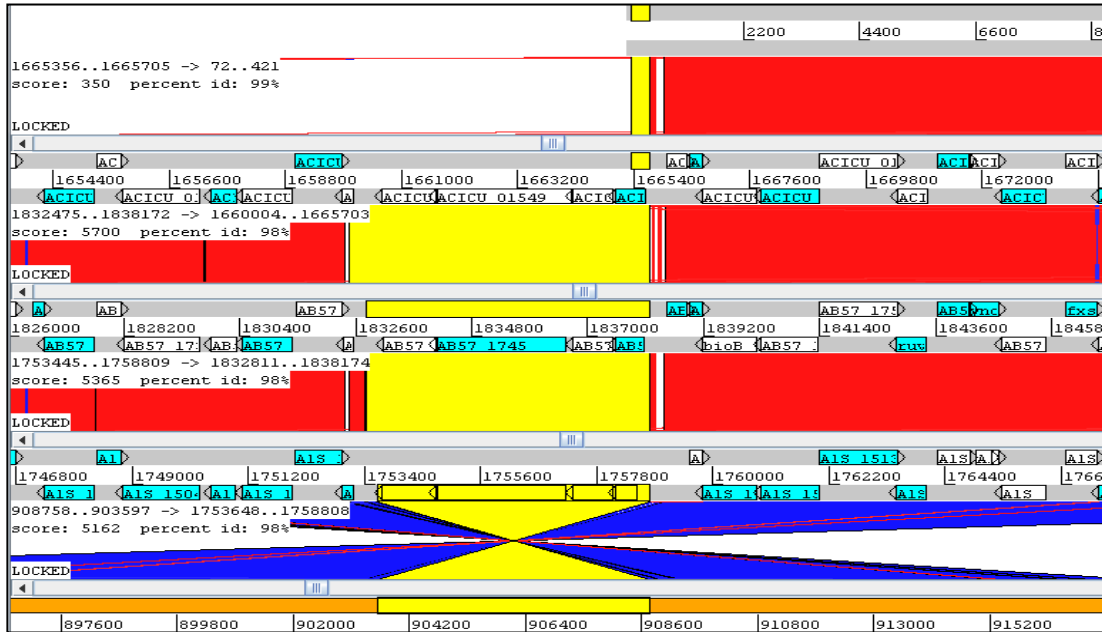


H) *pilZ*



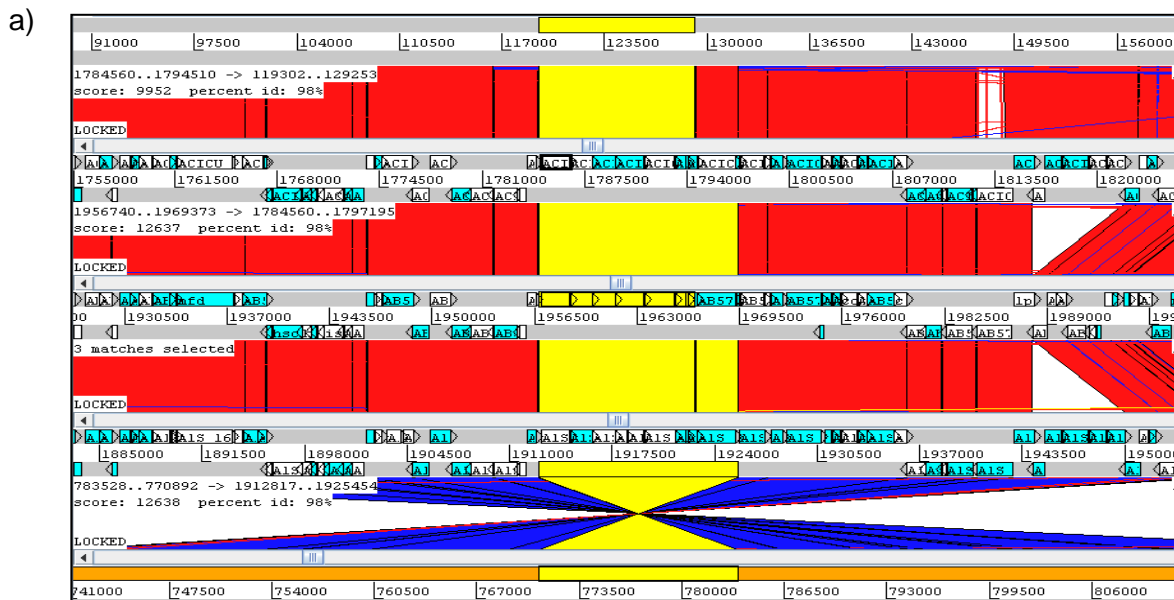
*Se compararon 5 genomas. De arriba hacia abajo, se encuentra *A. baumannii* 107m seguido de *A. baumannii* ACICU, AB0057, ATCC 17978 y en la última línea está *A. baumannii* ATCC 19606 reflejando una inversión que se explica porque los genes de esta cepa están transcritos en sentido inverso.

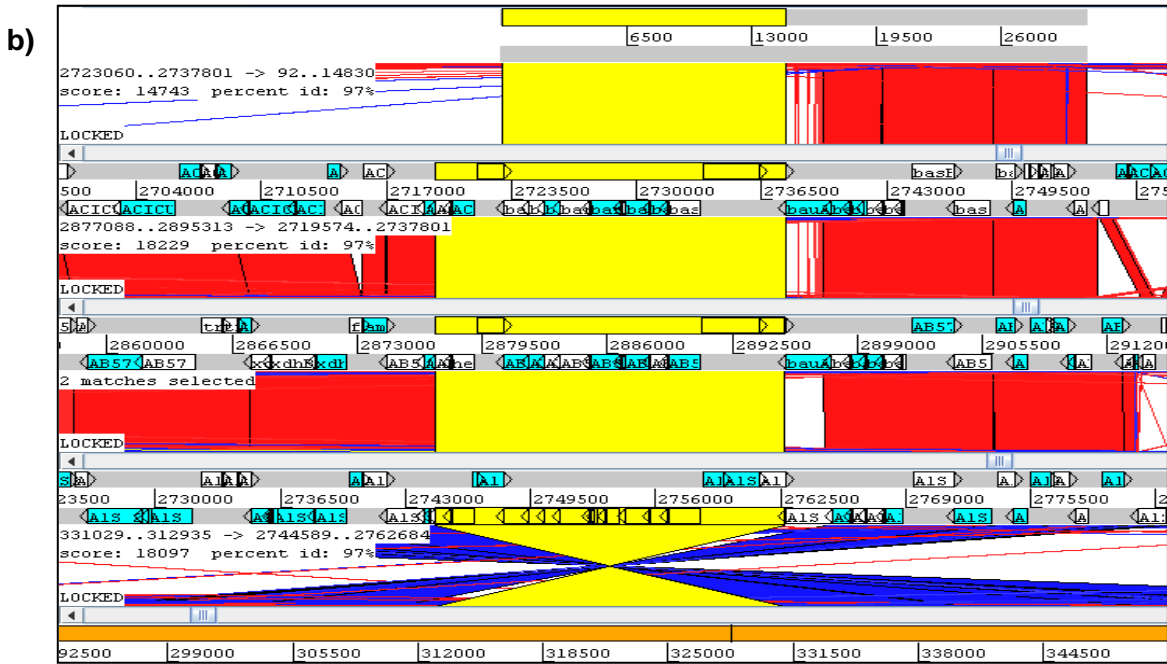
Figura 20: Mapa de sintenia del grupo de genes codificantes del sistema de pili tipo I



*Se compararon 5 genomas. De arriba hacia abajo, se encuentra *A. baumannii* 107m seguido de *A. baumannii* ACICU, AB0057, ATCC 17978 y en la última línea está *A. baumannii* ATCC 19606 reflejando una inversión que se explica porque los genes de esta cepa están transcritos en sentido inverso

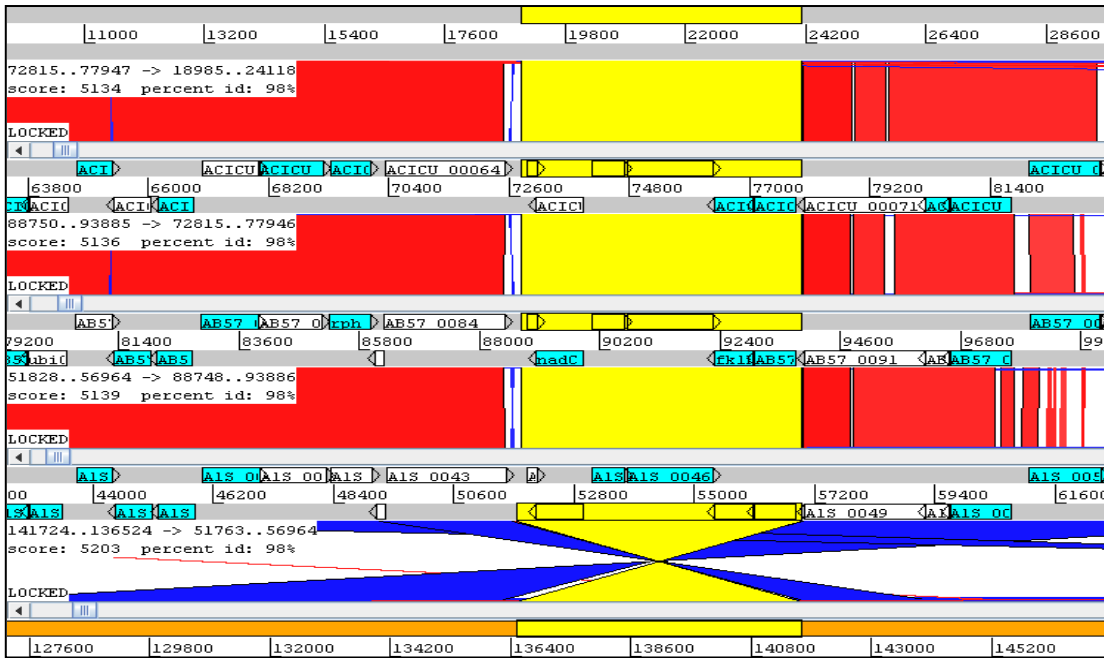
Figura 21: Mapa de sintenia del grupo de genes putativos codificantes del sideróforo putativo y del grupo de genes codificantes de proteínas encargadas de la biosíntesis del sideróforo acinetobactin





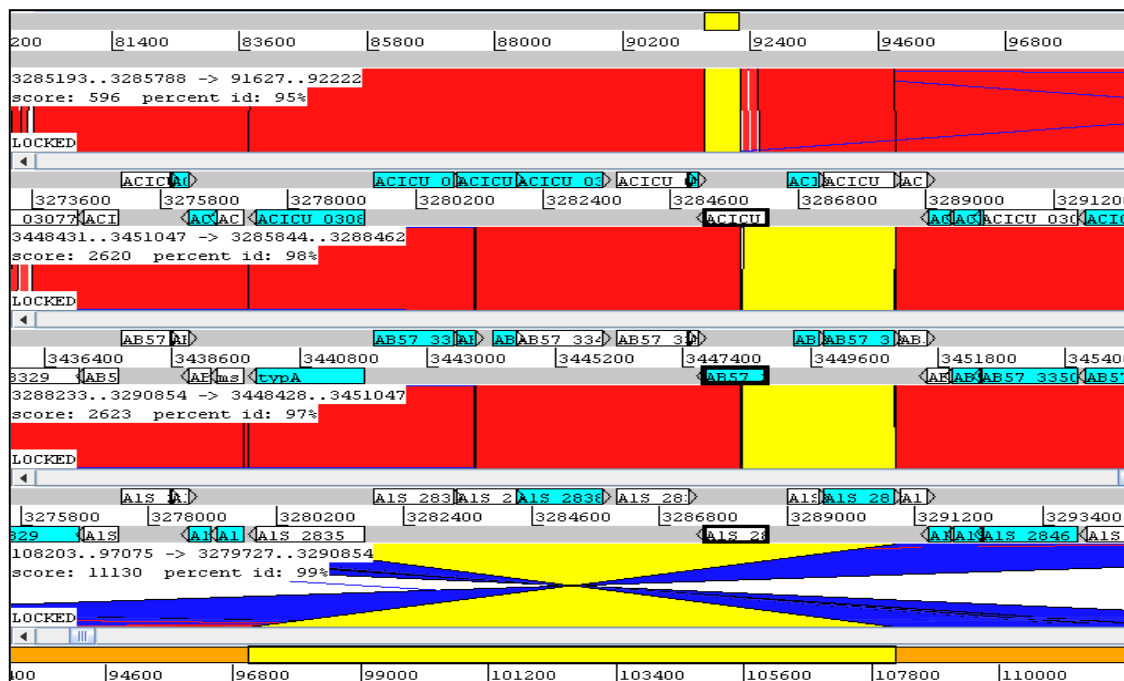
*Se compararon 5 genomas. De arriba hacia abajo, se encuentra *A. baumannii* 107m seguido de *A. baumannii* ACICU, AB0057, ATCC 17978 y en la última línea esta *A. baumannii* ATCC 19606 reflejando una inversión que se explica porque los genes de esta cepa están transcritos en sentido inverso. a) Grupo de genes putativos codificantes del sideróforo putativo b) Grupo de genes codificantes del sideróforo acinetobactin

Figura 22. Mapa de sintenia del grupo de genes codificantes de cápsula



*Se compararon 5 genomas, de arriba hacia abajo, se encuentra *A. baumannii* 107m seguido de *A. baumannii* ACICU, AB0057, ATCC 17978 y en la última línea está *A. baumannii* ATCC 19606 reflejando una inversión que se explica porque los genes de esta cepa están transcritos en sentido inverso

Figura 23: Mapa de sintenia del grupo de genes situados alrededor del gen *Omp38*



*Se compararon 5 genomas. De arriba hacia abajo, se encuentra *A. baumannii* 107m seguido de *A. baumannii* ACICU, AB0057, ATCC 17978 y en la última línea está *A. baumannii* ATCC 19606 reflejando una inversión que se explica porque los genes de esta cepa están transcritos en sentido inverso.

Es importante mencionar que a pesar de que los genes de la cepa de *A. baumannii* ATCC 19606 están transcritos en sentido inverso, estos conservan el mismo orden de los grupos de genes presentada en la cepa *A. baumannii* 107m y en las demás cepas de estudio.

5. Capítulo 5: Análisis y discusión de resultados

PRIMER OBJETIVO: Identificación genes codificantes de factores de virulencia en *A. baumannii* 107m

En el estudio del infectoma de *A. baumannii* 107m, se identificaron en total 113 genes codificantes para proteínas asociadas con virulencia, a continuación se presentará el respectivo análisis de cada uno de los genes encontrados:

5.1 Genes codificantes de sistemas de adherencia y motilidad

Se identificaron 30 genes del sistema de pili tipo IV, los cuales han sido previamente descritos en *Pseudomonas aeruginosa* (Mattick, 2002; Burrows, 2012). Estos genes se encontraron organizados en 7 grupos distribuidos en diferentes posiciones del genoma. Un primer grupo compuesto por los genes *pilR* y *pilS* (un sistema de dos componentes), implicados en la regulación transcripcional del gen *pilA* (mayor subunidad de pilina) y encargados de controlar la expresión o actividad del sistema. (Burrows *et al.*, 2012). Un segundo grupo, compuesto por los genes *pilD*, *pilC* y *pilB*, implicados en el ensamblaje del pili.

En *A. baumannii* 107m se evidenciaron los genes *pilC* y un gen *pilY1*, cada uno asociado con diferentes grupos de genes, los cuales podrían tener una función similar a la descrita previamente para otras especies bacterianas. (Mattick, 2002).

Un tercer grupo de genes identificado en *A. baumannii* 107m, está compuesto por los genes *pilU* y *pilT*, el gen *pilU*, se encuentra corriente abajo del gen *pilT*, son necesarios

para el ensamblaje, desensamblaje, degradación y retracción del pili. (Mattick, 2002; Burrows *et al.*, 2012)

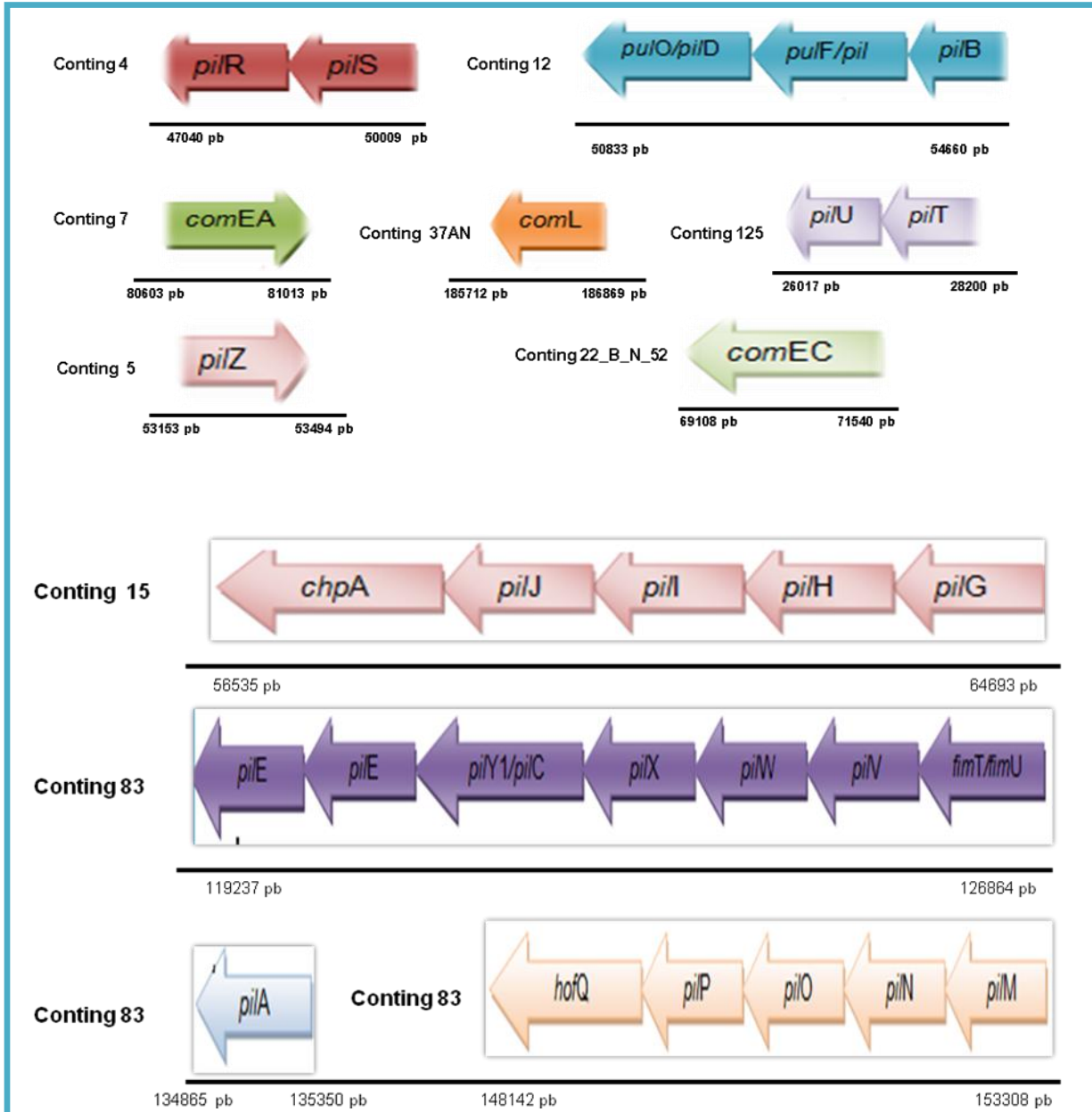
Un cuarto grupo de genes identificado en la cepa en estudio, lo constituyen un complejo de genes *chpA*, *pilJ*, *I*, *H* y *G* los cuales también están implicados en la regulación transcripcional de este complejo (Mattick, 2002).

Un quinto grupo de genes encontrados en *A. baumannii* 107m son los *pil* (*E*, *Y1/pilC*, *X*, *W*, *V* y *fimU*) involucrados en la biogénesis y función mecánica del pili. (Mattick, 2002; Eijkelkamp *et al.*, 2011; Peleg *et al.*, 2012) y un sexto grupo identificado en esta cepa está constituido por los genes *HofO*, *pilP*, *pilO*, *pilN* y *pilM*, descritos previamente para la cepa *A. baumannii* ATCC 17978 y para la cepa *P. aeruginosa*, se requieren para el ensamblaje, motilidad por contracción. (Mattick, 2002; Eijkelkamp *et al.*, 2011)

Se identificaron en *A. baumannii* 107m dos genes: *comEA* (una proteína transmembranal cuya función es unirse al ADN externo) y *comEC* (un transportador de ADN) en el genoma. Estos genes, según análisis genómicos realizados por Smith y cols (2007) en una cepa de *A. baumannii*, son homólogos a los genes *comP* y *comA* de los cuales carece, pero que compensa con otros de igual importancia como *pilQ*, *comE*, *pilF*, *comEA* y *comEC*, que cumplen un rol vital en la captación del ADN. La presencia de estos genes puede explicar la gran cantidad ADN exógeno que se encuentra generalmente en el cromosoma de *A. baumannii* incluyendo la cepa de *A. baumannii* 107m.

Los genes *pilA*, *comL*, *pilZ*, *fimA*, *comEA* y *comEC* se encontraron individualmente distribuidos en el genoma de *A. baumannii* 107m. La organización y orientación de los genes que conforman el sistema de pili tipo IV se pueden observar en la Figura 24

Figura 24: Grupo de genes que conforman el sistema de pili tipo IV en *A. baumannii* 107m.



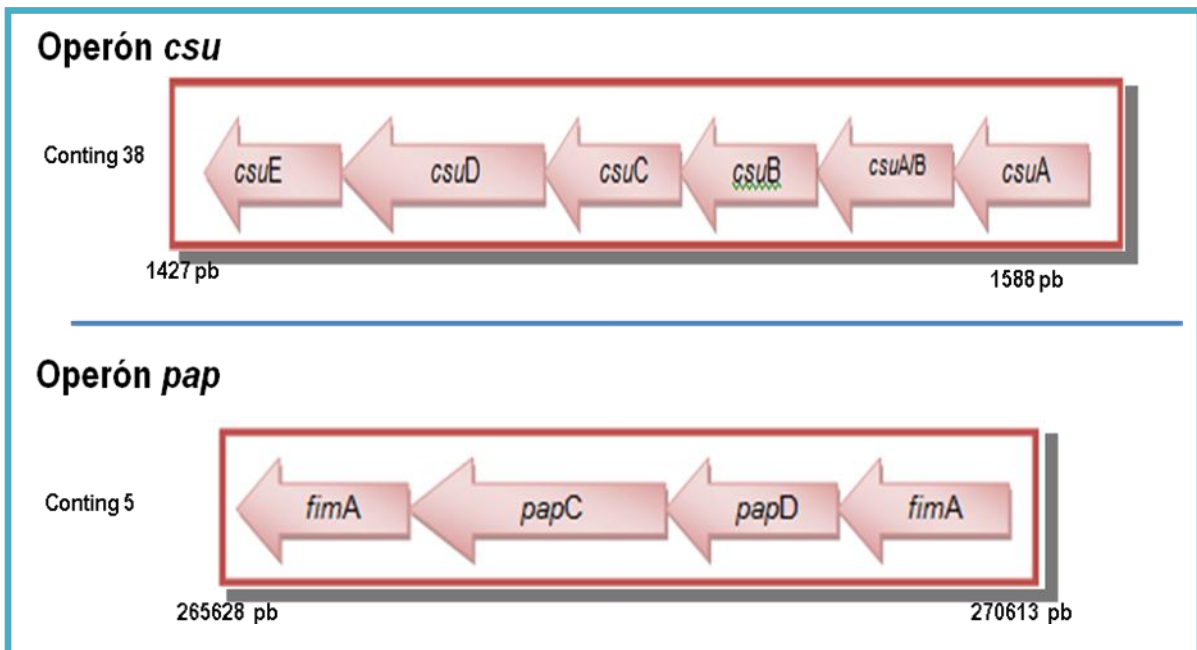
La presencia de estos genes codificantes para pili tipo IV, le permiten a la bacteria *A. baumannii* 107m tener una motilidad por contracción y una adherencia a una variedad de superficies, incluyendo superficies inertes, otras células bacterianas y células eucariotas, como un primer paso en la colonización de la superficie y contacto íntimo a través de la

retracción del pili. Por otro, lado la presencia de estos genes tiene un papel importante en la habilidad de la bacteria para formar biofilm.

En el genoma de *A. baumannii* 107m se encontró el gen *filF*, que forma parte de un sistema pili tipo III descritos en *Burkholderia cepacia*, asociado con procesos de adhesión a superficies (Marti *et al.*, 2011).

Finalmente en el genoma de *A. baumannii* 107m se identificaron dos operones que hacen parte del sistema de pili tipo I: el operón *pap* compuesto por 4 genes y el operón *csu* compuesto por 6 genes (Figura 25). Este tipo de pili, está constituido por un sistema de ensamblaje de proteínas chaperonas periplásmicas y proteínas de membrana externa. (Marti *et al.*, 2011)

Figura 25: Grupo de genes que conforman el sistema de pili tipo I en *A. baumannii* 107m (operón *csu* y operon *pap*)



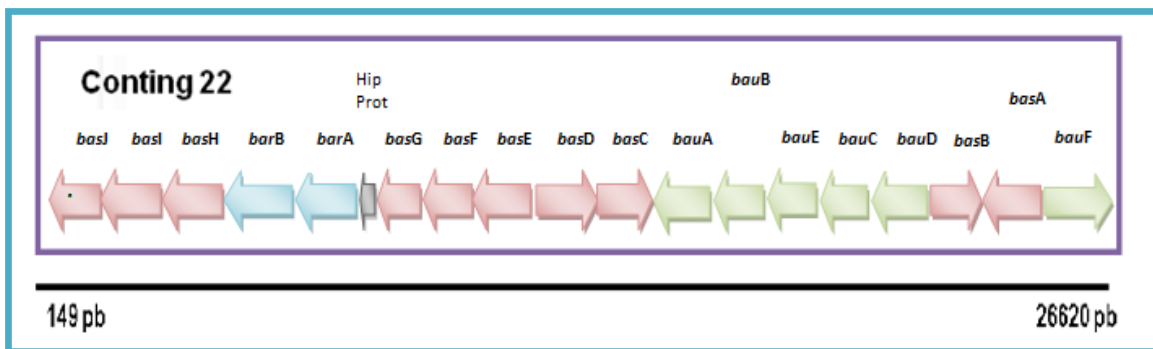
El análisis de los resultados muestra que la presencia de genes que participan en la construcción de múltiples sistemas de pili, requeridos para la adhesión bacteriana, podrían contribuir a la persistencia de *A. baumannii* 107m en los ambientes hospitalarios.

5.2 Genes codificantes encargados de la biosíntesis de Sideróforos

En el genoma de *A. baumannii* 107m de igual manera como lo reportado por Mihara y cols (2004) y Peleg y cols (2012) para la cepa *A. baumannii* ATCC 19606^T por Eijkelkamp y cols (2011) para las cepas ACICU, AYE, AB0057, se identificó el grupo de genes que conforman el sistema de biosíntesis del sideróforo de acinetobactin. Este grupo consta de 18 genes (*bas ABCDEFGHIJ*; *bau ABCDEF*; *bar A* y *bar B*) que contribuyen en la biosíntesis del sideróforo acinetobactin.

La organización genética de este grupo de genes se identificó en el siguiente orden: *basJ*, *basI*, *basH*, *barA*, *barB*, *basG*, *basF*, *basE*, *basD*, *basC*, *bauA*, *bauB*, *bauE*, *bauC*, *bauD*, *basB*, *basA* y *bauF* todos ellos encargados de la producción, transporte y secreción de este sideróforo. (Figura 26)

Figura 26: Organización del grupo de genes que contribuyen en la biosíntesis del sideróforo acinetobactin en el genoma de *A. baumannii* 107m.

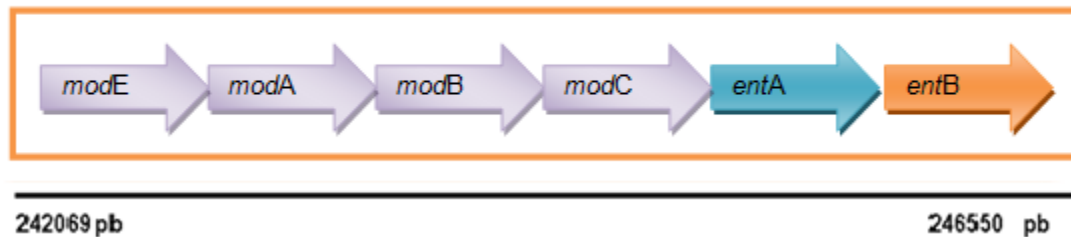


Además del grupo de los 18 genes identificados en el genoma de *A. baumannii* 107m, se encontró una secuencia corta de 156 pb, ubicada entre los genes *barA* y *basG*. Esta secuencia codifica para una proteína hipotética denominada ABIBUN_13536 y corresponde a una de las secuencias adicionales reportadas en el grupo de acinetobactin de las cepas *A. baumannii* AB0057 (AB57_2807) y ACICU (ACICU_02575). (Penwell *et al.*, 2012)

El gen *entA*, que codifica para una enzima 2,3-dihidro-2,3-dihidroxi-benzoato dehidrogenasa, esencial para la completa biosíntesis del sideróforo acinetobactin; se encontró en el genoma de *A. baumannii* 107m localizado dentro de otro grupo de genes diferente al grupo de genes que conforman el sistema de biosíntesis de acinetobactin. Este gen se encuentra corriente arriba de un grupo de 5 genes *modE modA- modB-modC* los cuales codifican para un sistema putativo de transporte de molibdeno y corriente abajo, por el gen *entB* como lo reportado en la cepa *A. baumannii* ATCC 19606^T (Peleg *et al.*, 2012) (Figura 27).

Figura 27. Organización genética del grupo de genes que contienen el gen *entA* en el genoma de *A. baumannii* 107m.

Conting 5



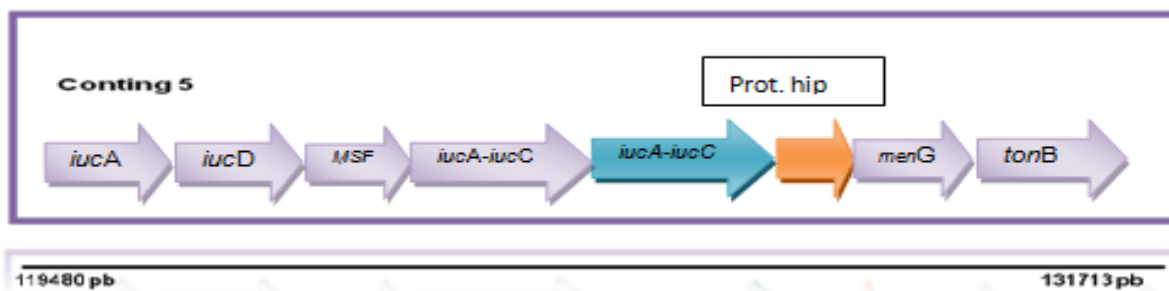
Se encuentra también que la ubicación del gen *entA* se localiza fuera del locus principal implicado en la biosíntesis, transporte y secreción de acinetobactin y es similar a la disposición de los genes necesarios para la biosíntesis del sideróforo de anguibactin reportado para la especie del patógeno de peces *Vibrio anguillarum* 775. (Di Lorenzo *et al.*, 2003)

Penweell y cols (2012) reportan que a pesar que la cepa *A. baumannii* AYE posee los genes codificantes para la biosíntesis del siderofo acinetobactin, el gen *entA* es un mutante natural incapaz de producir ácido-2,3-dihidroxibenzóico (DHBA) y acinetobactin. Se podría concluir que aunque el genoma en estudio posea estos genes no se garantiza su expresión activa hasta que se pueda corroborar funcionalmente.

En la búsqueda de genes codificantes para sideróforos en el genoma de estudio se encontró un segundo grupo de genes putativos con una actividad en la biosíntesis del sideróforo. En la cepa *A. baumannii* 107m, se evidenció un grupo de 8 genes (Ver tabla 9) asociado en la biosíntesis de sideróforo. Dentro de este grupo se encontró genes que codifican para proteínas de una bomba de eflujo MFS (ABIBUN_09010) y un receptor de hierro (ABIBUN_09035). Se ha reportado que este grupo de genes es conservado entre las cepas de *A. baumannii*. (Eijkelkamp *et al.*, 2011; Peleg *et al.*, 2012).

La organización genómica del grupo de genes en *A. baumannii* 107m se encuentra en la Figura 28.

Figura 28: Organización del grupo de genes putativos que conforman el sideróforo putativo en el genoma de *A. baumannii* 107m.

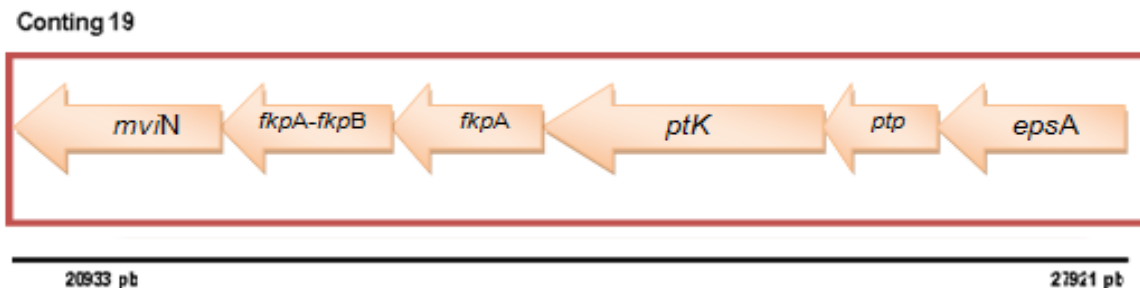


Otros genes identificados dentro del genoma *A. baumannii* 107m, asociados a la toma de hierro (ver anexo G) fueron el gen codificante para el receptor de sideróforo *fepA*, un receptor de enterobactina y colicina y genes codificantes del sideróforo bacteriferritin (*bfr*), un almacenador de hierro. (Marti *et al.*, 2011). También se encontraron 10 genes putativos para receptores de hierro y tres grupos de sistemas de traslocación de sideróforos férricos (*TonB EXBb-EXBD*) encargados del transporte de los sideróforos desde el espacio extracelular al citoplasma y de la permeabilidad específica de la envoltura celular. (Eijkelkamp *et al.*, 2011).

5.3 Genes codificantes para cápsula, fosfolipasas y proteínas de membrana externa asociadas a virulencia

En el genoma de *A. baumannii* 107m se encontraron genes como el *ptk*, que codifica una proteína putativa tirosina quinasa y el gen *epsA* que codifica para una proteína de membrana externa, exportadora de lipopolisacáridos. En *A. baumannii* 107m, estos genes se encontraron organizados en un grupo de 6 genes (*epsA*, *ptp*, *ptk*, *fkpA*, *fkpA-fkpB* y *MviN*). (Figura 29)

Figura 29: Organización de genes que contribuyen en la polimerización y ensamblaje de la cápsula en *A. baumannii* 107m.



Russo *et al.*, 2010 y Di Nocera *et al.*, 2011, han descrito estos mismos genes (*epsA*, *ptp* y *ptk*) en cepas *A. baumannii* AICICU, AYE, AB0057 y 307-0294. La identificación de estos genes en la cepa de estudio podría constituir una posible explicación de la resistencia de esta bacteria ante los mecanismos de defensa del hospedero.

Las fosfolipasas son importantes como factores de virulencia. En *A. baumannii* se han reportado 2 copias de fosfolipasa C (PC_PLC), las cuales fueron identificadas en la cepa *A. baumannii* 107m. Estos genes se encontraron distribuidos en el genoma al igual que en otras cepas de *A. baumannii* sin embargo, aún no hay suficiente evidencia de la actividad hemolítica de las dos copias de fosfolipasa C. (Vallenet *et al.*, 2008)

También se identificaron en el genoma de *A. baumannii* 107m 2 copias de fosfolipasa D y una copia de fosfolipasa A las cuales, en estudios previos, han sido descritas como uno de los mayores factores de virulencia en otras especies. (McKean *et al.*, 2007; Vallenet *et al.*, 2008).

Se identificó el operón que contiene el gen codificante para una proteína de membrana externa *Omp38* en *A. baumannii* 107m con la misma organización reportada según Gady y cols (2009) para la especie *A. baumannii* ATCC 19606. La presencia de este gen en la cepa de estudio podría darle la capacidad de inducir apoptosis de las células epiteliales actuando como un potencial factor de virulencia en las etapas tempranas de la infección (Choi *et al.*, 2005).

Se encontraron 3 genes *OmpW* distribuidos en diferentes posiciones en el genoma de *A. baumannii* 107m. Estos genes codifican para proteínas de membrana externa y están asociados a la virulencia en cepas *A. baumannii*.

Los genes identificados en *A. baumannii* 107m relacionados con el infectoma, pueden conferirle una posible capacidad virulenta que en pacientes críticos inmunosuprimidos, quemados o que se encuentren en unidades de cuidados intensivos (UCI) puede causar infección que será difícil de tratar por la multirresistencia que presenta a los diferentes grupos de antibióticos.

SEGUNDO OBJETIVO: Proteínas de membrana externa

El análisis de las tres replicas en electroforesis bidimensional indican que se detectan alrededor de 73 *spots* de forma reproducible.

Bajo las condiciones en las que se realizó el ensayo, se observaron más proteínas de carácter ácido, encontrándose en puntos isoeléctricos (pI) entre 4 y 6 y masas moleculares entre 80 y 40 kDa. La mayor cantidad de *spots* se evidencia con masas moleculares altas y puntos isoeléctricos cercanos a 5. Estos resultados concuerdan con

lo establecido en la literatura para la especie *Acinetobacter baumannii* (Siroy *et al.*, 2006; Vashist *et al.*, 2009; Soares *et al.*, 2009)

De las proteínas expresadas con una mayor intensidad, detectadas en la electroforesis bidimensional e identificadas por MALDI TOF-TOF, 2 están asociadas con la captación de hierro (*Ton B*) y 2 han sido involucradas en la protección de la bacteria frente a diferentes condiciones de estrés ambiental (*OmpW*).

En *A. baumannii* 107m se identificó una proteína, que se expresó en las dos cepas con la misma intensidad y que ha sido involucrada con apoptosis celular (*Omp38*)

En la comparación de las proteínas de membrana externa entre las cepas de *A. baumannii* (*A. baumannii* 107m y *A. baumannii* ATCC 19606) se evidenció gran similitud como se esperaría de aislamientos pertenecientes a la misma especie, sin embargo, algunas proteínas de *A. baumannii* 107m que se expresaron únicamente en esta cepa o tuvieron una expresión con mayor intensidad respecto a la cepa *A. baumannii* ATCC 19606 fueron las siguientes:

5.4 Receptores *TonB*

La secuencia de aminoácidos (aa) de la proteína identificada en este estudio como 6801 del proteoma de *A. baumannii* 107m, correspondió, en el genoma anotado de esta cepa, a un gen que codifica para una proteína de membrana externa receptora de hierro denominada *ferric aerobactin receptor precursor (Cloacin receptor)* compuesta de 772 aminoácidos. El tamaño del gen codificante de esta proteína es de 2319 pares de bases y al realizar un blast con la secuencia aminoácidos y un blast con la secuencia de nucleótidos frente a los genomas de esta especie reportados en la base de datos, se obtiene un porcentaje del 99% identidad con un cubrimiento del 100%.

El gen codificante de esta proteína hace parte de un grupo de 8 genes putativos con actividad en la biosíntesis del sideróforo y se encuentra en el contig 5 del genoma anotado de *A. baumannii* 107m. (Tabla 9). Este grupo de genes ha sido previamente descrito en *A. baumannii* 17978 por Eijkelkamp y cols, 2011, quienes reportan que los

receptores que se expresan en la superficie de la membrana externa bacteriana, juegan un papel crucial en el reconocimiento de sideróforos de hierro y por lo tanto en la absorción del mismo.

El *spot* identificado como 6802 en el proteoma de *A. baumannii* 107m, correspondió en el genoma anotado de esta cepa, a un gen que codifica la misma proteína de membrana externa receptora de hierro, denominada *ferric aerobactin receptor precursor (Cloacin receptor)* compuesta de 772 aminoácidos. (Tabla 9). El tamaño del gen codificante de esta proteína es de 2319 pares de bases y al realizar un blast con la secuencia de aminoácidos y un blast con la secuencia de nucleótidos con los genomas de esta especie reportados en la base de datos, se obtiene un porcentaje del 99% identidad con un cubrimiento del 100%.

Sin embargo, esta secuencia de aminoácidos (6802) varía en 4 aminoácidos con respecto a la secuencia anotada en el genoma de *A. baumannii* 107m. El primer aminoácido diferente se encuentra ubicado en la posición 14, cambia una serina (S) por alanina (A); el segundo aminoácido se ubica en la posición 90, cambia una glutamina (Q) por una lisina (K); el tercer aminoácido se ubica en la posición 212, cambia una serina (S) por una glicina (G) y el cuarto aminoácido se ubica en la posición 315, cambia una treonina (T) por una isoleucina (I). Estas sustituciones de aminoácidos debido a unas mutaciones puntuales del gen, pudieron originar cambios en la secuencia de aminoácidos confiriéndole una ventaja adaptativa en la posible capacidad virulenta de esta cepa (Cain *et al.*, 2013).

Por otro lado en los resultados de electroforesis bidimensional (Figura 3) se evidencia una diferencia mínima entre estas dos proteínas respecto a su punto isoeléctrico lo que indica la presencia de una isoforma de *TonB* (Tabla 15), que podría conferirle una ventaja en la captación y competencia por el poco hierro que deja libre el hospedero presente en compuestos como la ferritina, transferrina o la lactoferrina, lo cual le proporcionaría la posibilidad de utilizar diferentes fuentes de hierro y mejorar su capacidad para colonizar, satisfacer sus requerimientos nutricionales y tener una función biológica importante en el

establecimiento de bacteremias y otras infecciones contribuyendo a la posible virulencia de esta cepa (Braun & Hantke, 2011; McConnell *et al.*, 2012).

De acuerdo con los resultados obtenidos, se expresaron dos proteínas de unión al hierro (*TonB*), únicamente en *A. baumannii* 107m en comparación con *A. baumannii* ATCC 19606. A pesar que las dos cepas fueron cultivadas en un medio Luria Bertani (LB) sin ninguna modificación, los resultados, se podría atribuir a la adaptación que tuvieron las bacterias a las diferentes condiciones de las que fueron aisladas (*A. baumannii* 107m de un paciente con bacteremia y *A. baumannii* ATCC 19606 adquirida del laboratorio del IBUN), además, de los antecedentes nutricionales, que en el caso de *A. baumannii* 107m al estar en condiciones limitantes de hierro, nutriente esencial, los receptores *TonB* se expresaron, cumpliendo un rol importante en la supervivencia y colonización exitosa de *A. baumannii* 107m bajo las condiciones impuestas por el huésped en el momento de la infección. Por esta razón podría ser posible que estas proteínas (*TonB*) se encuentren en el extracto de membrana externa de este aislamiento.

Estos resultados de la cepa de *A. baumannii* 107m, son consistentes con los publicados por Siroy y cols (2006), quienes identificaron una proteína *TonB-dependent siderophore receptor* que se expresaba únicamente en la cepa *A. baumannii* resistente (Cepa aislada de dos pacientes que se encontraban en cuidados intensivos) pero no en la cepa *A. baumannii* ATCC 19606. (Cepa de referencia obtenida de la colección del Instituto Pasteur, París).

5.5 *OmpW*

En el perfil proteómico de *A. baumannii* 107m dos de las proteínas de membrana externa, que tuvieron una expresión diferencial con respecto a *A. baumannii* ATCC 19606, fueron identificadas como *OmpW* enumeradas como 4103 y 4902. (Figura 4a).

El *spot* identificado como 4103 correspondió a una proteína de membrana externa (*Outer membrane protein W*) compuesta por 193 aminoácidos que se encuentra codificada por un gen que contiene 582 pares de bases, al realizar un blast con la secuencia de

aminoácidos y la secuencia de nucleótidos con los genomas de esta especie reportados en la base de datos, se obtienen porcentajes entre el 98 y 99 % de identidad con un cubrimiento del 100%. El gen que codifica para esta proteína se encuentra en el contig 12 del genoma anotado de *A. baumannii* 107m. Este *spot* tuvo mayor intensidad en *A. baumannii* 107m en comparación con la cepa ATCC 19606. Esta proteína ha sido asociada a la protección de la bacteria frente a varias condiciones de estrés ambiental tales como: salinidad, temperatura, disponibilidad de nutrientes y de oxígeno. (McClean, 2012).

El *spot* 4902 solamente se expresó en el genoma de *A. baumannii* 107m y fue identificado por espectrometría de masas como una “*outer membrane protein W*”. Esta proteína está compuesta por 193 aa, está codificada por un gen que contiene 582 pares de bases y al realizar un blast con la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos con los genomas de esta especie reportados en la base de datos, se obtienen porcentajes entre el 98 y 99 % de identidad con un cubrimiento del 100%.

Esta proteína corresponde en el genoma anotado de *A. baumannii* 107m a un gen que codifica para la misma proteína identificada para el *spot* 4103. Sin embargo, se evidencia una variación notoria en cuanto a la masa molecular (kDa) (Figura 3a), que podría explicarse posiblemente por la fase de crecimiento a partir del cual se hizo el estudio proteómico (fase tardía exponencial). Estudios realizados por Soares y cols. (2010) sobre los cambios del proteoma, según las fases de crecimiento en una cepa *A. baumannii* bajo estrés oxidativo, demostraron que la presencia de isoformas, con variación en su masa molecular, depende de la fase de crecimiento en la que se encuentren las cepas. En el caso de *A. baumannii* 107m a pesar que no estuvo bajo ningún estrés, las proteínas si fueron extraídas después de 8 horas de crecimiento cuando su densidad óptica alcanzó los 0.8 nm, fase en la cual posiblemente ya había un estrés debido al agotamiento de recursos y a la acumulación de compuestos tóxicos (Madigan *et al.*, 2006)

Por otro lado, esta diferencia en la masa molecular puede deberse a una modificación postraduccional producida por proteólisis. (Morales & Gallo, 2006; Cain *et al.*, 2013)

Resultados similares fueron obtenidos en un estudio de proteínas de membrana externa para esta misma especie realizados por Vashist y cols (2009) quienes identificaron, en una cepa de *A. baumannii* resistente a betalactámicos, obtenida por el Departamento de Microbiología, del Instituto de India de Ciencias Médicas, (Nueva Delhi), dos isoformas de la proteína *OmpW* con una variación significativa en la masa molecular (66 kDa, y 20 kDa). Estas proteínas presentaron una mayor expresión con respecto a la cepa sensible ATCC 19606. En otros estudios proteómicos en cepas de *A. baumannii* multi-resistentes, realizados por Soares y cols (2009) y Siroy y cols (2006) solo se han identificado isoformas de *OmpW* con masas moleculares entre 19 y 20 KDa y puntos isoeléctricos de 5.1.

La expresión de *OmpW* en *A. baumannii* 107m posiblemente desempeña un papel protector durante la invasión al huésped confiriéndole una capacidad virulenta evitando la fagocitosis por los macrófagos y promoviendo la proliferación bacteriana y persistencia, que conduce a su propagación y al establecimiento de la enfermedad infecciosa.

Otros *spots* identificados que tuvieron una expresión diferencial en *A. baumannii* 107m con respecto a *A. baumannii* ATCC 19606 correspondieron a una putative outer membrane protein, (*spot* 2204) y una hypothetical protein ACICU_00960, (*spot* 3402) (Figura 4a). En el genoma anotado de *A. baumannii* 107m el *spot* 2204 correspondió a un gen que contiene 1701 pares de bases y que codifica para una proteína *Omp25* compuesta por 255 aa encontrada en el contig 83_A_N_10. Al realizar un blast con la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos frente a los genomas de esta especie reportados en la base de datos, se obtiene un porcentaje del 99% identidad con un cubrimiento del 100%.

En el caso del *spot* 3402 (Figura 4a), este correspondió a un gen que contiene 1443 pares de bases y que codifica para una proteína *hypothetical protein* compuesta por 480 aminoácidos y que se encuentra localizado en el contig 28. Al realizar un blast con la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos frente a los genomas de esta especie reportados en la base de datos, se obtiene un porcentaje del 98% y 100% con un cubrimiento del 100%. Estas proteínas no han sido estudiadas y por ende no se pueden asociar como posibles factores de virulencia en la cepa de *A. baumannii* 107m

En el perfil proteómico de *A. baumannii* 107m se identificó una proteína que se expresó bajo la misma intensidad en las dos cepas de estudio (*A. baumannii* 107m y ATCC19606). EL spot identificado 5404 (Figura 4a) en el proteoma de *A. baumannii* 107m, correspondió en el genoma anotado de esta cepa a un gen que codifica para una *putativa outer membrane protein Omp38, partial*, compuesta de 342 aminoácidos cuyo gen contiene 1029 pares de bases. Al realizar un blast con la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos frente a los genomas de esta especie reportados en la base de datos, se obtiene un porcentaje entre el 88 y 90% con un cubrimiento del 99%. Este gen codificante de la proteína *Omp38* está ubicado en el *conting* 15 del genoma anotado de *A. baumannii* 107m. Resultados similares han sido reportados por Vashist y cols (2009) para la cepa resistente de *A. baumannii* RS 307 [(colectada por el Departamento de Microbiología, del Instituto de India de Ciencias Médicas, (Nueva Delhi))] y para la cepa ATCC 19606.

La expresión de la proteína *Omp38* en las dos cepas de estudio *A. baumannii* se relaciona con el hecho de que esta proteína, pertenece a la familia de la *OmpA*, la cual es la más abundante en las membranas externas de *A. baumannii* y funciona principalmente como una porina en la membrana externa. Sin embargo, en cepas de *A. baumannii* se ha asociado como un importante factor de virulencia que induce apoptosis en las células epiteliales en las primeras etapas de la infección (Choi *et al.*, 2005) y se ha reportado que la *OmpA* juega un papel importante en la formación de biofilm sobre superficies de plástico y es absolutamente necesaria para la fijación a las células epiteliales (Gaddy *et al.*, 2009)

La expresión de la proteína *Omp38* en la cepa *A. baumannii* 107m contribuye a su posible patogenicidad, en el mecanismo de adherencia a superficies abióticas como los catéteres y formación de biofilm, así como en la fijación a células epiteliales en el momento en que se inicia la infección.

Por otro lado, en *A. baumannii* ATCC 19606 se identificó el spot 5503-1 (Figura 4b) el cual tuvo una expresión diferencial con respecto a *A. baumannii* 107m y fue identificado

como una proteína “*Outer membrane protein A*” compuesta de 337 aminoácidos, y un peso aproximado de 36 kDa. Esta proteína al ser una porina tiene altos niveles de expresión (Koebnik *et al.*, 2000), en especial en las cepas sensibles a los diferentes grupos de antibióticos. A diferencia en la cepa *A. baumannii* 107m esta proteína tuvo un nivel menor de intensidad lo que se puede relacionar con la multirresistencia de estas cepas de *A. baumannii* a β -lactámicos, particularmente a imipenem (Siroy *et al.*, 2006)

Finalmente, al comparar los datos obtenidos con los reportados por estudios proteómicos para estas cepas se encontró que, las proteínas *OmpW* y *Omp38* que fueron identificadas por MALDI TOF-TOF en *A. baumannii* 107m coinciden con dos de las proteínas reportadas por Soares y cols (2009), en un estudio de proteínas de una cepa de referencia de *A. baumannii* ATCC 17978

Los resultados obtenidos del proteoma de membrana externa de *A. baumannii* 107m coinciden con los reportados en otros estudios (Vashist *et al.*, 2009; Siroy *et al.*, 2006; Soares *et al.*, 2009; Soares *et al.*, 2010) asociadas con factores de virulencia, resaltando que estas mismas proteínas también están presentes en los proteomas de membrana de bacterias de esta misma especie.

Análisis tercer objetivo

En general la mayoría de genes asociados a factores de virulencia identificados en *A. baumannii* 107m, están presentes en las cepas de *A. baumannii* ACICU, AB0057, ATCC 19606 y ATCC 17978 y el porcentaje obtenido de identidad oscila entre el 98 y 99%

Los resultados obtenidos utilizando WebACT, reflejan que los grupos de genes codificantes para factores de virulencia identificados en *A. baumannii* 107m, comparados con los genomas de *A. baumannii* ACICU, AB0057, ATCC 19606 y ATCC 17978, presentan la misma organización. Esto demuestra una conservación de estos grupos de genes, no obstante su variada procedencia (sangre, heridas, orina, líquido cefalorraquídeo, meningitis), las diferentes áreas geográficas de donde provenían y su fenotipo de resistencia.

5.6 Comparación de genes codificantes de pili tipo I y IV

Se presentó un alto grado de sintenia entre de los grupos de genes codificantes para la formación de pili I y IV [tipo I (operón *pap* compuesto por 4 genes, operón *csu* compuesto por 6 genes) y tipo IV (compuesto por 29 genes) (Anexo G)], presentes en *A. baumannii* 107m y los genomas de *A. baumannii* ACICU, AB0057, ATCC 19606 y ATCC 17978. (Figuras 6, 7 y 8). Esto contribuye en la adherencia y en la formación de biofilm en superficies, de dispositivos médicos de plástico como ventiladores mecánicos, catéteres. lo que podría contribuir a la persistencia de estas bacterias en los hospitales. (Tomaras *et al.*, 2003; Marti *et al.*, 2011; Peleg *et al.*, 2012). Sin embargo se encontraron algunas variaciones, tres de los genes *pil* identificados en la cepa 107m *pilX* (*putative type IV fimbrial biogenesis protein*), *pilV* (*type IV fimbrial biogenesis protein*) y *pilT* (*putative type IV fimbrial biogenesis protein*), e identificados en ACICU, AB0057, ATCC 19606, y que han sido reportados ser genes indispensables en la participación de la adhesión, no se encontraron en la cepa de ATCC 17978. (Antunes *et al.*, 2011).

Respecto al gen *pilA*, la secuencia de este gen es diferente para cada cepa de *A. baumannii*, esto se corroboró al realizar un alineamiento (Blast) cuyo resultado indica que la secuencia del gen *pilA*, no es similar a la que presentan los otros genes *pilA* de los genomas de *A. baumannii* ACICU, AYE, AB0057 y ATCC 19606.(Tabla 17, Figura 18)

Esta variación en la secuencia y la longitud del gen *pilA* entre las diferentes cepas de *A. baumannii*, se podría explicar porque el gen *pilA* o pilina al ser importante para la captación de DNA y transformación natural, puede variar en los diferentes patógenos por la presión de la selección de pili específicos de bacteriófagos o por la necesidad de adaptación a diferentes ambientes. (Graupner & Wackernagel, 2001; Mattick, 2002).

Por otro lado, otros genes encontrados en el genoma de *A. baumannii* 107m y en los genomas utilizados en la comparación, fueron el *filF* y *N-acyl-L-homoserine lactone*

synthetase, asociados a la formación de biofilm. La presencia de estos genes le dan la capacidad a las cepas de *A. baumannii* de sobrevivir en superficies secas por largos periodos de tiempo, momento en el que podrán fijarse y persistir en las superficies abióticas, así como también contribuir en la resistencia a la respuesta inmune del huésped y a los diferentes ambientes en los que se pueden desarrollar. (Sahl *et al.*, 2013; Vallenet *et al.*, 2008)

5.7 Comparación de genes codificantes de sideróforos

En *A. baumannii* 107m y las cepas de *A. baumannii* ACICU, AB0057 y ATCC 19606 se encontraron conservados los dos grupos de genes codificantes de proteínas encargadas de la biosíntesis y utilización de sideróforos (grupo 1 y 2) y el grupo en el que se encuentra el gen *entA* necesario para la completa biosíntesis del sideróforo acinetobactin (grupo 2) (AnexoG). El primer grupo conformado por 8 genes putativos, encargados de la biosíntesis de un sideróforo putativo parece ser que se encuentra únicamente en especies de *A. baumannii*, muy conservado entre estas especies. (Peleg *et al.*, 2012; Sahl *et al.*, 2013). (Figura 12)

El segundo grupo de genes, encargados de la biosíntesis del sideróforo acinetobactin se encontró en el genoma de *A. baumannii* 107m compuesto por 18 genes con la misma organización genómica en las especies de *A. baumannii* utilizadas en este estudio. (Figura 10)

Estos resultados pueden indicar una ventaja adaptativa para la cepa *A. baumannii* 107m lo que contribuiría en la posible patogénesis en el proceso de invasión y persistencia intracelular en el momento de infección, indicando que la adquisición de hierro mediada por este sideróforo es un importante factor de virulencia en las especies de *A. baumannii*, que podría ser utilizado como un objetivo para fines terapéuticos.

Se encontraron algunas variaciones en la organización genómica de los genes encargados de la biosíntesis del sideróforo de acinetobactin entre la cepa *A. baumannii*

107m y la cepa ATCC 17978. El grupo de genes en el que se encuentra el gen *entA* y que es necesario para la completa biosíntesis del sideróforo acinetobactin, no se encontró presente en el genoma *A. baumannii* ATCC 17978. (Figura 11). Estos resultados ya han sido reportados en Penwell y cols (2012), en un estudio sobre la localización del gen *entA* en el genoma de *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606. En este trabajo informan que el genoma de *A. baumannii* ATCC 17978, presenta un grupo de genes adicional (A1S_2562 a A1S_2581) posiblemente involucrados en la biosíntesis y utilización del sideróforo.

En el genoma de *A. baumannii* 107m, también se identificaron 13 genes que codifican para receptores *TonB*, 2 de los cuales no se encontraron en las cepas de *A. baumannii* ACICU, AB0057, ATCC 19606 y ATCC 17978. (Anexo G). Estos dos receptores identificados como ABIBUN_09880 y ABIBUN_09885 podrían darle una posible ventaja adaptativa a la cepa de *A. baumannii* 107m en el momento de captación del poco hierro libre en el establecimiento y colonización del hospedero.

5.8 Comparación de genes codificantes de proteínas de membrana externa y de genes codificantes para el ensamblaje y polimerización de la cápsula

En el genoma de *A. baumannii* 107m, se encontró un solo gen codificante de la proteína *OmpA* (*Omp38*). Este gen *ompA* es común en las especies de *A. baumannii* compartiendo entre un 85 y 88% identidad con un cubrimiento del 99% en la secuencia de nucleótidos. También comparten la misma organización genética con las cepas de *A. baumannii* ACICU, AB0057, ATCC 19606 y ATCC 17978. (Figura 16). En *A. baumannii*, se ha confirmado su efecto apoptótico en las células epiteliales y su papel en la adherencia en las primeras etapas de formación de biofilm a las superficies (Gaddy *et al.*, 2009).

Por otro lado, los tres genes *ompW* que fueron identificados en el genoma de *A. baumannii* 107m, han sido reportados en las cepas de *A. baumannii* ACICU, AB0057, ATCC 19606 Y ATCC 17978. En bacterias Gram negativas los genes *ompW* contribuyen

en el desarrollo de resistencia frente a la respuesta inmune del hospedero y de esta manera poder llegar a establecerse y causar infección (Wu *et al.*, 2013). En este sentido, la presencia de estos genes en los genomas de *A. baumannii* podrían conferirle una función asociada a la virulencia, en la medida que permite que la bacteria pueda sobrevivir en el ambiente de estrés impuesto por el hospedero.

La organización de los genes (*ptk* y *EpsA*) asociados con la polimerización y biosíntesis de la cápsula se encontró en el genoma de *A. baumannii* 107m de igual manera como la reportada por Russo y cols (2010) para los genomas de *A. baumannii* ATCC 17978, AB0057, ACICU, SDF, ATCC 19606, AB3070294 y AB979. (Figura 14). Estos resultados sugieren que *A. baumannii* 107m, al poseer estos genes junto con la presencia de otros factores de virulencia, se incentiva su persistencia y resistencia ante las defensas del organismo hospedero. Por otro lado al ser estos genes tan importantes para el desarrollo de la cápsula se podrían convertir en un blanco para disminuir la capacidad de proliferación de estas bacterias, el crecimiento y establecimiento en el hospedero y posiblemente evitar que causen infección.

Finalmente, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la comparación de la cepa *A. baumannii* 107m con las cepas *A. baumannii* ACICU, AB0057, ATCC 17978 y ATCC 19606, se concluye que que la bacteria de estudio podría ser una especie virulenta, dado que contiene los genes asociados con la virulencia que han sido reportados en estudios genómicos y biológicos previos para las cepas mencionadas anteriormente además de tener una organización conservada de los mismos.

6. Capítulo 6: Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

- El análisis del genoma de *A. baumannii* 107m evidenció la presencia de 113 genes 41 involucrados en la adherencia, 48 colonización y 24 en infección, que hacen que esta bacteria, posiblemente pueda tener una ventaja adaptativa al ambiente encontrado en los hospitales de Colombia y a las condiciones de respuesta inmune que son impuestas por el hospedero. La expresión de estos genes bajo estas condiciones le podrían dar la capacidad de adherirse, formar biofilm en superficies bióticas y abióticas, captar el hierro y otros nutrientes esenciales para su desarrollo, evadir los mecanismos de defensa del hospedero y finalmente causar infección.
- En la investigación realizada, la aplicación de la técnica de electroforesis bidimensional seguida al análisis por espectrometría de masas (MALDI-TOF-TOF), permitió identificar 8 proteínas en membrana externa de las cuales 5 proteínas fueron asociadas a factores de virulencia: 4 proteínas que estaban diferencialmente expresadas respecto a la cepa *A. baumannii* ATCC 19606; 2 proteínas *TonB* que contribuyen en la colonización, dos proteínas *OmpW* que contribuyen en el proceso invasión y 1 proteína *Omp38*, asociada con la invasión del hospedero.
- La comparación de los genes identificados asociados con virulencia en *A. baumannii* 107m con las cepas *A. baumannii* ACICU, AB0057, ATCC 19606 y ATCC 17978, permite concluir que la cepa de estudio posee los grupos de genes

que se han reportado ser conservados entre las bacterias de esta especie y que son necesarios para considerarlas como cepas virulentas. Estos resultados aportan información sobre la posible capacidad virulenta del microorganismo de estudio, como patógeno causante de infecciones asociadas al cuidado de la salud, en los hospitales colombianos.

6.2 Recomendaciones

- ❖ Se sugieren estudios con modelos biológicos para confirmar la virulencia en la cepa *A. baumannii* 107m.
- ❖ Para avanzar en el conocimiento proteómico sería conveniente analizar toda la membrana de la cepa de *A. baumannii* 107m.
- ❖ Sería necesario realizar una comparación genómica de los genes asociados a factores de virulencia de la cepa *A. baumannii* 107m con las otras cepas del complejo aisladas de los hospitales colombianos para ampliar el conocimiento de las mismas.

Bibliografía

- Adams, M., Goglin, K., Molyneaux, N., Hujer, K., Lavender, H., Jamison, J., MacDonald, I., Martin, K., Russo, T., Campagnari, A., Hujer, A., Bonomo, R., Gill, S. (2008). Comparative Genome Sequence Analysis of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Bacteriology*. 190 (24): 8053–8064
- Anderson, NL., Anderson, NG. (1998). Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis* 19(11):1853-1861.
- Antunes, LCS., Imperi, F., Carattoli, A., Visca, P. (2011). Deciphering the Multifactorial Nature of *Acinetobacter baumannii* Pathogenicity. *PLoS ONE* 6(8): e22674.
- Aranda, Jesús. (2008). Caracterización de los sistemas de captación de zinc y de hierro en *Streptococcus suis*: Potencial antigénico y protector. Universitat Autònoma de Barcelona. Departamento de Genética y Microbiología. España. Tesis doctoral en Microbiología.
- Baron, S. (1996). *Medical Microbiology*, 4a Ed. University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, Texas. p. 172
- Bergogne-Berézín, E., Friedman, H., Bendinelli, M. Eds. 2012. *Acinetobacter Biology and Pathogenesis. Infectious Agents and Pathogenesis*. Capítulo 8. Braun G. Springer. Berlin. p.145
- Burrows, L. (2012). *Pseudomonas aeruginosa Twitching Motility: Type IV Pili in Action*. *Annual Review of Microbiology*. 66: 493-520
- Braun, V., Hantke, K. (2011). Recent insights into iron import by bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology*. 15(2): 328–334.

- Cain, JA., Solis, N., Cordwell, SJ. (2013). Beyond gene expression: The impact of protein post-translational modifications in bacteria. *Journal of Proteomics*. In Press. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2013.08.012>
- Carver, TJ. , Rutherford, KM., Berriman, M., Rajandream, MA., Barrell, BG., Parkhill, J. (2005). ACT: the Artemis Comparison Tool. *Bioinformatics*. 21(16): 3422-3423
- Choi, CH., Lee, EY., Lee, YC., Park, TI., Kim, HJ., *et al.* (2005). Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. *Cell Microbiol* 7(8): 1127–1138.
- Costa, G.F.M., M.C.B. Tognim, C.L., Cardoso, F.E., Carrara- Marrone, C., Marrone, and Garcia L.B. (2006). Preliminary evaluation of adherence on abiotic and cellular surfaces of *Acinetobacter baumannii* strains isolated from catheter tips. *Braz J. Infect. Dis.* 10(5):346–351.
- den Bakker, H. C., Cummings, C. A., Ferreira, V., Vatta, P. *et al.* (2010). Comparative genomics of the bacterial genus *Listeria*: genome evolution is characterized by limited gene acquisition and limited gene loss. *BMC Genomics* 11:688. Online <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/11/688>
- De la Rosa, M., Prieto, J., Navarro, J. (2011) *Microbiología de ciencias de la salud. Conceptos y aplicaciones*. Tercera edición. Elsevier. Barcelona, España. p. 31-33
- Di Lorenzo, M., Stork, M., Tolmasky, M. E. & 9 other authors (2003). Complete sequence of virulence plasmid pJM1 from the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* strain 775. *J Bacteriol* 185 (19): 5822–5830.
- Di Nocera, P., Rocco, F., Giannouli, M., Triassi, M., Zarrilli, R. (2011). Genome organization of epidemic *Acinetobacter baumannii* strains. *BMC Microbiology*. 11:224. Online <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/11/224>

- Doughary, H., Ndakidemi, P., Human, I., and Benade, S. (2011). The Ecology, Biology and Pathogenesis of *Acinetobacter* spp. An Overview. *Microbes Environ.* 26 (2): 101–112.
- Eijkelkamp, B., Hassan, K., Paulsen, I., Brown, M. (2011). Investigation of the human pathogen *Acinetobacter baumannii* under iron limiting conditions. *BMC Genomics.* (12):126-140
- Falkow, S. (1997). What is a pathogen? *Am. Soc. Microbiol. News:* 63: 359-365.
- Falkow, S. (1988). Molecular Koch's postulates applied to microbial pathogenicity. *Rev. Infect. Dis.* 10: S274-S276.
- Gaddy, J., Tomaras, A., and Actis, L. (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.
- Gordon, N., Wareham, D. (2010). Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. Review. *International Journal of Antimicrobial Agents* 35(3): 219–226
- Gould IM. (2008). The epidemiology of antibiotic resistance. *Int J Antimicrob Agents*; 32 (Suppl. 1):S2–S9.
- Graupner, S., Wackernagel, W. 2001. *Pseudomonas stutzeri* has two closely related *pilA* genes (type IV pilus structural protein) with opposite influences on natural genetic transformation. *J. Bacteriol.*183(7):2359–66
- Hernández, M., Valenzuela E., Pulido, Y., Reguero, MT., Restrepo, S., Mantilla, J. (2011). Identificación a nivel de genomoespecie de aislamientos clínicos del complejo *Acinetobacter baumannii*-*Acinetobacter calcoaceticus*, mediante RFLP-PCR de la región intergénica espaciadora de los genes 16S y 23S rRNA. *Rev. Biotec.* XIII (1): 110-114

- Huang, S., Triche, T and Jong, A. (2001). Infectomics: genomics and proteomics of microbial infections. Review. *Funct Integr Genomics*. 1(6):331–344
- Iacono, M., Villa, L., Fortini, D., Bordoni, R., Imperi, F., Bonnal, R.J., Sicheritz-Ponten, T., De Bellis, G., Visca, P., Cassone, A., Carattoli, A. (2008). Whole genome Pyrosequencing of an Epidemic Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* strain Belonging to the European clone II group. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 52(7):2616-25.
- Jacobs, A., Hood, I., Boyd, K., Olson, P., Morrison, J., Carson, S., Sayood, K., Iwen, P., Skaar, E., and Dunman, P. (2010). Inactivation of Phospholipase D Diminishes *Acinetobacter baumannii* Pathogenesis. *Infection and Immunity*, 78 (5): 1952–1962.
- Jin, JS., Kwon, S-O., Moon, DC., Gurung, M., Lee, JH., *et al.* (2011). *Acinetobacter baumannii* Secretes Cytotoxic Outer Membrane Protein A via Outer Membrane Vesicles. *PLoS ONE* 6(2): e17027.
- Juhas, M., Crook, DW., Dimopoulou, ID., Lunter, G., Harding, RM., Ferguson, DJ., *et al.* (2007) Novel type IV secretion system involved in propagation of genomic islands. *J Bacteriol*. 189(3):761-771.
- Koebnik, R., Locher, K.P., Van Gelder, P., 2000. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol. Microbiol*. 37(2): 239–253.
- Lee, S., Kim, NJ., Choi, S., Kim, TH., Chung, JW., Choo, EJ., Kwak, YG. *et al.* (2004). Risk factors for acquisition of Imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: a case-control study. *Antimicrob Agents Chemother* 48(1): 224-228.
- Lipsitch, M. & Moxon, E. R. (1997). Virulence and transmissibility of pathogens: what is the relationship? *Trends Microbiol*. 5 (1): 31-37.
- Llosa, M., Roy, C., Dehio, C. (2009). Bacterial type IV secretion systems in human disease. *Mol Microbiol*. 73(2):141-151.
- Madigan, M., Martinko, J., Parker, J. (2006). Brock, *Microbiología de los microorganismos*. Decima edición Pearson Prentice Hall. Madrid. p. 729-231

- Martín, M., Ballesteros, M. (2010) MONOGRAFÍA XXX: Biomarcadores: Analítica, diagnóstico y terapéutica (2010). Capítulo 4. P.113-168
- Marti, S., Nait, Chabane., Alexandre, S., Coquet, L., Vila, J., *et al.*, (2011) Growth of *Acinetobacter baumannii* in Pellicle Enhanced the Expression of Potential Virulence Factors. PLoS ONE 6(10): e26030.
- Mattick, J. (2002). Tipo IV pili and Twitching Motility. Annu. Rev. Microbiol. 56:289–314.
- McClean, S. (2012). Eight stranded β -barrel and related outer membrane proteins: Role in bacterial pathogenesis. School of Science and Computing. p. 1-39
- McConnell, M., Actis, L., Pachon, J. (2012). *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. FEMS Microbiology reviews. 37(2):130-155
- McKean, SC., Davies, JK., Moore, RJ. (2007). Expression of phospholipase D, the major virulence factor of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, is regulated by multiple environmental factors and plays a role in macrophage death. Microbiology 153(Pt7): 2203–2211.
- Mihara, K., T. Tanabe, Y., Yamakawa, T., Funahashi, H., Nakao, S. Narimatsu, and Yamamoto, S. (2004). Identification and transcriptional organization of a gene cluster involved in biosynthesis and transport of acinetobactin, a siderophore produced by *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606T. Microbiology 150:2587-2597.
- Molloy, M., Herbert, B., Slade, M., Rabilloud, T., Nouwens, A., Williams, K., Gooley, A. (2000). Proteomic analysis of the Escherichia coli outer membrane. Eur. J. Biochem. 267(10): 2871- 2881
- Morales Sánchez, D. & Gallo Ramírez LE. (2006). Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México Curso: Métodos Físico-Químicos en Biotecnología: Plataformas de Proteómica. Online http://pt7mdv.ceingebi.unam.mx/computo/pdfs/met/plataformas_de_proteomica.pdf

- Mortensen, B., Skaar, E. (2012). Host–microbe interactions that shape the pathogenesis of *Acinetobacter baumannii* infection. *Microreview Cell Microbiology* 14(9): 1336-1344-
- Moxon, E. R. (1997). Applications of molecular microbiology to vaccinology. *Lancet* 350 (9086): 1240-1244.
- Moxon, R., Tang, C. (2000). Challenge of investigating biologically relevant functions of virulence factors in bacterial pathogens. *The Royal Society*. 355(1397): 643-656
- Murray, P., Rosenthal, K., Pfaller, M. (2009). *Microbiología Médica*. Sexta edición. Elsevier. Barcelona España .p. 16-17
- Naimi, I., Nazer, M., Ong, L., Thong, E. (2009). The Role of wza in Extracellular Capsular Polysaccharide Levels During Exposure to Sublethal Doses of Streptomycin. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology* 13:36-40
- Ochman, H., Moran, NA. (2001). Genes lost and genes found: evolution of bacterial pathogenesis and symbiosis. *Science*. 292(5519): 1096–1099
- Paragioudaki, M., Stamouli, V., Kolonitsiou, F., *et al.* (2004). Intravenous catheter infections associated with bacteraemia: a 2-year study in a University Hospital. *Clin Microbiol Infect*. 10(5):431-435.
- Park, J., Kim, S., Kim, S., Cha, S., Lim, S., Kim, J. (2011). Complete Genome Sequence of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Strain 1656-2, Which Forms Sturdy Biofilm. *Journal of Bacteriology*. 193 (22): 6393–6394
- Peleg, AY., Seifert, H., Paterson, DL. (2008). *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev* 21(3): 538–582.
- Peleg, AY., de Brij, A., Adams, MD., Cerqueira, GM., Mocali, S., *et al.* (2012). The Success of *Acinetobacter* Species; Genetic, Metabolic and Virulence Attributes. *PLoS ONE* 7(10): e46984.

- Penwell, W., Arivett, B., Actis, L. (2012). The *Acinetobacter baumannii* *entA* Gene Located Outside the Acinetobactin Cluster Is Critical for Siderophore Production, Iron Acquisition and Virulence. PLoS ONE 7(5): e36493.
- Playford EG, Craig JC, Iredell JR. (2007). Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in intensive care unit patients: risk factors for acquisition, infection and their consequences. J Hosp Infect 65(3): 204-211
- Prashanth, K., Badrinath, S. (2005) Epidemiological investigation of nosocomial *Acinetobacter* infections using arbitrarily primed PCR & pulse field gel electrophoresis. Indian J Med Res. 122(5):408-418.
- Proft, T., Baker, E. (2009). Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria - structure, assembly and their role in disease. Cell Mol Life Sci 66(4): 613–635.
- Russo, T., Luke, N., Beanan, J., Olson, R., Sauberan, S., MacDonald, U., Schultz, W., Umland, T., and Campagnari, A. (2010). The K1 Capsular Polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* Strain 307-0294 Is a Major Virulence Factor. Infection and Immunity. 78 (9): 3993-4000
- Skaar EP (2010) The Battle for Iron between Bacterial Pathogens and Their Vertebrate Hosts. PLoS Pathog 6(8): e1000949. doi:10.1371/journal.ppat.1000949
- Sahl JW, Gillece JD, Schupp JM, Waddell VG, Driebe EM, et al. (2013). Evolution of a Pathogen: A Comparative Genomics Analysis Identifies a Genetic Pathway to Pathogenesis in *Acinetobacter*. PLoS ONE 8(1): e54287.
- Shin, J., Lee, H., Kim, S., and Kim, J. (2009). Proteomic Analysis of *Acinetobacter baumannii* in Biofilm and Planktonic Growth Mode. The Journal of Microbiology. 47(6): 728-735
- Siroy, A., Cosette, P., Seyer, D., Guiller, C., Vallenet, A., Mariotte, S., Jouenne, T., De, E. (2006). Global Comparison of the Membrane Subproteomes between a Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Strain and a Reference Strain. Journal of Proteome Research 5(12): 3385-3398

- Soares, N., Cabral, M., Gayoso, C., Mallo, S., Velo, P., Moreira, F., Bou, G. (2010) Associating Growth-Phase-Related Changes in the Proteome of *Acinetobacter baumannii* with Increased Resistance to Oxidative Stress. *Journal of Proteome Research*. 9(4): 1951–1964
- Smith, MG., Gianouls, TA., Pukatzki, S., Mekalanos, JM., Ornston, LN., Gerstein, M., Snyder, M. (2007). New insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis. *Gene and Development*. 21(5): 601-14.
- Soares, NC., Cabral, MP., Parreira, JR., Gayoso, C., Barba, MJ., Bou, G. (2009). 2-DE analysis indicates that *Acinetobacter baumannii* displays a robust and versatile metabolism. *Proteome Science Bio Med Central*, 37 (9):1-10
- Sokurenko, EV., Chesnokova, V., Dykhuizen, DE., Ofek, I., Wu, XR., Krogfelt, KA., Struve, C., Schembri, MA., Hasty, DL. (1998). Pathogenic adaptation of *Escherichia coli* by natural variation of the FimH adhesin. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(15):8922–8926
- Tomaras, AP., Dorsey, CW., Edelmann, RE., Actis, L. (2003). Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology* 149(Pt12): 3473–3484.
- Tomaras, A., Flager, M., Dorsey, C., Gaddy, J., Actis, L. (2008). Characterization of a two-component regulatory system from *Acinetobacter baumannii* that controls biofilm formation and cellular morphology. *Microbiology*. 154(Pt11): 3398–3409.
- Tortora, G., Berdell, F., Case, C. (2007) *Introducción a la microbiología*. Editorial Panamericana Novena Edición. Madrid, España. p. 452-454
- Vallenet, D., Nordmann, P., Barbe, V., Poirel, L., Mangenot, S., Bataille, E., Dossat, C., Gas, S., Kreimeyer, A., Lenoble, P., Oztas, S., Poulain, J., Segurens, B., Robert, C., Abergel, C., Claverie, J., Raoult, D., Médige, C., Weissenbach, J., Cruveiller, S. (2008). Comparative analysis of *Acinetobacters*: Three Genomes for three Lifestyles. *Plos One* 3(3): e1805.

- Vashist, J., Tiwari, V., Kapil, A., and Moganty, R., Rajeswari. (2009). Quantitative Profiling and Identification of Outer Membrane Proteins of β -Lactam Resistant Strain of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Proteome Research* 9(2): 1121–1128
- Vidal, R., Dominguez, M., Urrutia, H., Bello, H., Garcia, A., Gonzalez, G., *et al.* (1997). Effect of imipenem and sulbactam on sessile cells of *Acinetobacter baumannii* growing in biofilm. *Microbios.* 91(367):79–87.
- Wu, X-B., Tian, L-H., Zou, H-J., Wang, C-Y., Yu, Z-Q., Tang, C-H., Zhao, F-K., Pan, J-Y. (2013). Outer membrane protein OmpW of *Escherichia coli* is required for resistance to phagocytosis. *Research in Microbiology.* 164(8): 848-855

ANEXO A
Multirresistencia de *A. baumannii* 107m

| Antibiótico | Valor de referencia (<i>Acinetobacter</i>) | | | Resultado (mm) | Interpretación |
|-----------------------------|--|-------------|-----|----------------|----------------|
| | S | I | R | | |
| B- LACTÁMICOS | | | | | |
| Ampicilina (10 µg) | >15 | 10 Hasta 14 | <11 | <6 | Resistente |
| CEFALOSPORINAS | | | | | |
| Cefotaxima (30 µg) | >23 | 15 Hasta 22 | <14 | 10 | Resistente |
| CARBAPENÉMICOS | | | | | |
| Imipenem (10 µg) | >16 | 14 Hasta 15 | <13 | 10 | Resistente |
| Meropenem (10 µg) | >16 | 14 Hasta 15 | <13 | <6 | Resistente |
| LIPOPÉPTIDOS | | | | | |
| Colistina | - | - | - | <6 | Resistente |
| AMINOGLICÓSIDOS | | | | | |
| Amikacina (30 µg) | >17 | 15 Hasta 16 | <14 | <6 | Resistente |
| Gentamicina (10 µg) | >15 | 13 Hasta 14 | <12 | <6 | Resistente |
| TETRACICLINAS | | | | | |
| Tetraciclina (30 µg) | >15 | 12 Hasta 14 | <11 | <6 | Resistente |
| FLUOROQUINOLONAS | | | | | |
| Ciprofloxacina (5 µg) | >21 | 16 Hasta 20 | <15 | <6 | Resistente |
| INHIBIDOR DE FOLATOS | | | | | |
| Trimetoprim sulfa | >16 | 11 Hasta 15 | <10 | <6 | Resistente |

*Información obtenida Vannesa Florez

Concentración mínima inhibitoria en medio sólido (MIC) (CLSI, 2013)

| Antibióticos | Valor de referencia | | | Resultado µg/ml | Interpretación |
|----------------|---------------------|----|-----|-----------------|----------------|
| | S | I | R | | |
| Gentamicina | <4 | 8 | >16 | 1024 | Resistente |
| Amikacina | <16 | 32 | 64 | 64 | Resistente |
| Tetraciclina | <4 | 8 | >16 | 128 | Resistente |
| Ciprofloxacina | <1 | 2 | >4 | 1024 | Resistente |
| Colistina | <2 | - | >4 | 32 | Resistente |

*Información obtenida Vannesa Florez

Referencia:

CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement*. CLSI document M100-S23. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013. 33(1): 184 pag. Wayne, PA.

ANEXO B

Obtención del ADN a partir del lisado

1. Adicionar solución buffer ATL hasta completar 180ug o 180 ul, asumiendo que el peso del pellet es igual en volumen y resuspender homogéneamente.
2. Adicionar 20 ul de solución de proteinasa K, mezclar homogéneamente.
3. Incubar a 56 °C
4. Centrifugar brevemente para recolectar gotas adheridas en la parte interna de la tapa del tubo.
5. Adicionar 4 ul de RNasa (100mg/ml). Mezclar durante 15 minutos en vortex. De un pulso de 5 segundos e incube durante 5 minutos a 37 ° C
6. Dar un pulso de 5 segundos y adicionar 200 ul de solución Buffer AL. Mezclar durante 15 segundos en vortex, para lograr una solución homogénea. Incubar a 70 °C durante 10 minutos. Centrifugar brevemente para recolectar gotas adheridas en la parte interna de la tapa del tubo. (Nota: No hay problema si se forma un precipitado blanco que no se disuelve)
7. Adicionar 200 ul de etanol absoluto (96-100%) que previamente se ha atemperado.
8. Mezclar en vórtex durante al menos 15 segundos

ANEXO C

Purificación del ADN en columnas de Qia-Gen

1. Detapar cuidadosamente la columna usando guantes estériles.
2. Aplicar la mezcla del lisado obtenido en el proceso previo del lisado (incluya el precipitado) Evitar humedecer el borde de la columna. Cerrar la tapa de la columna. Centrifugar a temperatura ambiente durante 1 minuto a 8000 rpm (6000 xg). Recordar que la columna debe quedar localizada en un tubo de recolección de 2 ml. Nota: Si el líquido no ha pasado completamente, aumentar la velocidad de la centrifugación. Descartar el filtrado.
3. Transferir la columna a un nuevo tubo de colección de 2 ml
4. Aplicar 500 ul de solución buffer AW1. Proceder en forma similar a los pasos 1 y 2
5. Trasferir la columna a otro tubo de colección de 2 ml. Centrifugar a la máxima velocidad por 1 minuto (A toda o full) será a 17000 rpm por 1minuto.
6. Transferir la columna a un tubo de 1.5 ml nuevo y estéril
7. Adicionar 200 ul de agua o buffer AE calentado previamente a 60 ° C. Incubar durante 5 minutos antes de centrifugar.
8. Centrifugar a temperatura ambiente durante 1 minuto a 8000 rpm (6000 xg). Recordar que la columna debe quedar localizada en el tubo de recolección de 2.0 ml
9. Repetir los pasos 7 y 8 dos veces más hasta obtener un eluido de 600 ul.
10. Retirar la columna.
11. Cuantificar.

ANEXO D

Cuantificación del ADN por Qubit

1. Establecer sus tubos: va a necesitar dos tubos para los estándares y un tubo para cada muestra
2. Preparar la solución de trabajo Quant-iT™, diluyendo el reactivo Quant-iT™ 1:200 en el buffer de Quant-iT™. Para cada muestra y para el estándar se requieren 200 ul de la solución de trabajo
3. Preparar los tubos de ensayo de acuerdo a la siguiente tabla:

| | Estándar | Muestras usuario |
|--|-----------------|------------------|
| | Tubos de ensayo | Tubos de ensayo |
| Volumen de solución de trabajo (Desde el paso 2) adicionar | 190 ul | 180-199 ul |
| Volumen de estandar (desde el kit) adicionar | 10 ul | - |
| Volumen de la muestra de usuario. Adicionar | - | 1-20 ul |
| Total volumen en cada tubo de ensayo | 200 ul | 200 ul |

4. Colocar en el vórtex todos los tubos por 2-3 segundos.
5. Incubar los tubos por 2 minutos a temperatura ambiente
6. Leer los tubos in fluorometro Qubit™

ANEXO E
Genes asociados a virulencia reportados con más frecuencia en *A. baumannii*

| Adhesión | | |
|-------------------------------|--|---|
| FACTORES DE VIRULENCIA | GENES | FUNCIÓN |
| Pili tipo I | <i>fimA, papC, papD, fimA, csuABCDE</i> | Adherencia a superficies bióticas y abióticas |
| Pili tipo IV | <i>pilR-pilS, pilD, pilC, pilD, pilU, pilT, chpA, pilJ, pill, pilH, pilG, pilE, pilE, pilY1, pilX, pilN, pilV, fimT/fimU, hofQ, pilP, pilO, pilN, pilM, pilZ, pilA</i> | Adherencia a superficies bióticas y abióticas |

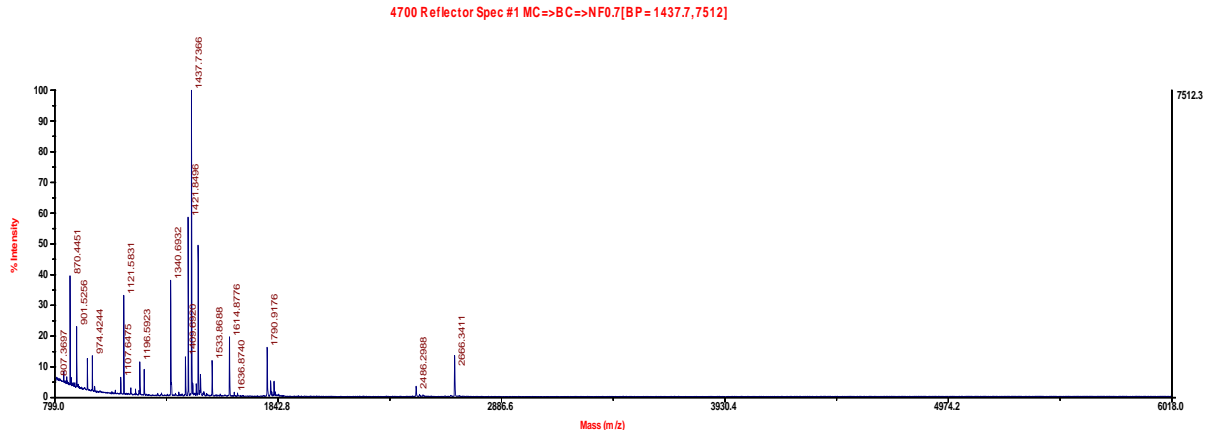
| COLONIZACIÓN | | |
|---|---|--------------------------------------|
| FACTORES DE VIRULENCIA | GENES | FUNCIÓN |
| Sideróforos y receptores de hierro | <i>basA B C D E F G H I J, bauA B C D E F, barA, barB</i> | Biosíntesis sideróforo acinetobactin |
| | <i>tonB</i> | Receptor de hierro |
| | <i>fepA</i> | Receptor de hierro |
| | <i>Bfr</i> | Almacenador de hierro |

| INVASIÓN | | |
|--------------------------------------|-----------------------|----------------------------------|
| FACTORES DE VIRULENCIA | GENES | FUNCIÓN |
| Cápsula | <i>ptk, ptp, epsA</i> | Evasión respuesta inmune |
| Proteínas de membrana externa | <i>ompA</i> | Apoptosis de células epiteliales |
| Fosfolipasas C, A, D | <i>plc, pld, pla</i> | Evasión de la respuesta inmune |

ANEXO F

Spectros de masas correspondientes a las proteínas identificadas en *Acinetobacter baumannii* 107m y ATCC 19606

Espectro de masa correspondiente a la proteína identificada como “putative outer membrane protein Omp38, partial” de *Acinetobacter baumannii* 107m



Lista de masas MS (m/z) y MS/MS (m/z) obtenidas experimentalmente:

807.369690, 841.091553, 870.445068 ions(38.931335, 43.742855, 55.031307, 69.023895, 69.459785, 72.063499, 74.036652, 83.017830, 84.064735, 85.279671, 87.031395, 95.056633, 97.013367, 109.022087, 120.081665, 129.068573, 141.031967, 157.074738, 169.040405, 184.090683, 195.053543, 202.090607, 211.087967, 213.066101, 219.087341, 228.079330, 241.117538, 244.073517, 245.161453, 246.101196, 247.102051, 257.126709, 260.822815, 261.080139, 263.043243, 284.161530, 295.108429, 311.105530, 344.106903, 345.143707, 346.044861, 362.084290, 363.143372, 385.242523, 394.175293, 435.141724, 459.184723, 460.110626, 467.194855, 476.835754, 476.992828, 477.099274, 479.043335, 489.107208, 512.139221, 590.234436, 606.145691, 607.121521, 610.081970, 611.146301, 623.975159, 627.135620, 678.052246, 678.237671, 679.106140, 679.947876, 681.368530, 694.132935, 695.147034, 724.096252, 753.019531, 770.861389, 799.949280, 852.183655, 855.355530, 901.525574, 951.536804, 974.424438, 1107.647461, 1121.583130, 1196.592285, 1216.563110, 1340.693237, 1344.673706, 1409.692017, 1421.849609 ions(44.024647, 70.046280, 72.052460, 84.070930, 86.066116, 120.074669, 129.088135, 136.087601, 147.116791, 175.118958, 186.084167, 198.064621, 213.104111, 226.202469, 233.170074, 248.253204, 254.160461, 260.888367, 261.132690, 272.142334, 276.185791, 332.225525, 333.190857, 357.773468, 359.984833, 360.213989, 389.224579, 433.224030, 473.273529, 488.284698, 502.350159, 504.292938, 516.351379, 543.217285, 544.251465, 560.945313, 561.265015, 585.311890, 586.298706, 629.383911, 635.388916, 643.310181, 656.336609, 673.372314, 673.868408, 674.255371, 714.319519, 748.363770, 769.399963, 770.389404, 771.444275, 786.693054, 787.286133, 787.444153, 860.885010, 861.422485, 869.453674, 886.317566, 918.402222, 989.308289, 1049.247925, 1128.531250, 1145.415283, 1146.206543, 1147.748047, 1148.631592, 1174.206177, 1274.192505, 1275.015991, 1276.526611, 1292.983765, 1402.204102), 1437.736572 ions(38.927475, 44.013996, 60.019596, 70.035522, 72.054070, 86.072281, 112.048096, 116.066879, 129.058731, 130.045013, 131.077209, 136.063309, 141.069168, 157.090073, 158.010529, 158.093842, 159.065536, 173.543259, 175.093979, 185.091919, 187.077545, 213.132080, 214.107208, 215.109238, 244.116180, 246.134430, 254.213028, 256.258820, 262.086212, 272.138641, 278.115967, 295.182129, 315.128510, 317.134277, 327.191650, 332.365692, 333.163116, 343.188965, 353.199707, 371.179199, 386.145935, 407.191467, 431.164215, 448.190826, 468.208893, 485.284210, 521.185791, 536.291443, 547.232666, 597.285461, 614.225342, 614.383911, 620.238281, 644.223572, 661.326294, 674.338501, 691.209534, 761.327820, 806.310242, 807.256531, 824.072144, 824.305542, 834.362549, 891.319275, 953.158691, 990.456482, 1031.402710, 1033.334229, 1050.051147, 1418.100464), 1443.836792, 1459.793091, 1468.791138 ions(38.922539, 44.022076, 58.027580, 70.026276, 72.070251, 74.044228, 84.058197, 86.061295, 87.050568, 101.093803, 112.053314, 113.076614, 115.118469, 120.042786, 129.087952, 130.098465, 136.040619, 157.043716, 174.909576, 175.109726, 181.055374, 185.121185, 186.062759, 187.130814,

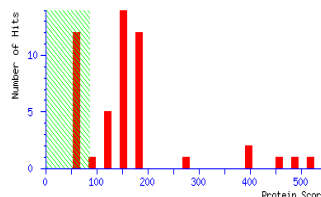
226.137314, 243.069122, 244.107727, 255.087128, 276.145905, 278.161896, 285.136841, 301.236969, 317.177094, 321.079254, 333.205414, 399.142487, 402.097656, 425.182526, 430.306122, 448.129791, 458.287292, 467.243317, 468.127594, 484.201080, 485.296844, 487.289276, 510.237244, 512.260071, 513.260864, 515.358215, 527.279053, 554.289856, 556.302124, 561.297913, 584.332092, 594.287659, 596.250183, 601.231873, 612.275085, 613.194458, 614.369873, 629.325989, 655.384277, 672.348816, 674.309326, 683.376709, 700.309509, 711.356201, 723.306702, 726.317932, 752.345459, 757.356384, 769.116699, 769.343628, 781.417236, 786.373047, 794.639771, 823.352905, 828.440552, 833.375305, 838.383118, 839.789001, 840.338379, 850.350098, 856.403931, 913.343140, 937.352112, 956.543091, 968.081848, 984.439148, 994.420776, 995.333618, 1011.157043, 1029.483765, 1114.566650, 1124.502441, 1131.446045, 1207.499268, 1221.226685, 1222.822021, 1223.575195, 1225.164551, 1226.729248, 1294.517822, 1305.551758, 1313.349731, 1323.069214, 1332.611084, 1340.117798, 1416.553955, 1422.315063, 1422.719849, 1423.560669, 1424.452271, 1432.999756, 1449.296387, 1449.878174, 1452.603882, 1453.274414, 1453.922363, 1456.584351, 1457.251099, 1475.714966, 1479.692017, 1495.705688, 1533.868774, 1614.877563 ions(10.396996, 44.022617, 84.065025, 86.089539, 120.060974, 129.064072, 172.095032, 173.117416, 175.111038, 185.134842, 187.171951, 215.148544, 235.092590, 243.128067, 248.675339, 281.197845, 302.180756, 311.177948, 319.172119, 343.174347, 360.255981, 361.391327, 375.208923, 390.205963, 425.257294, 440.297760, 474.227264, 474.387115, 486.314026, 488.260620, 537.237671, 553.305542, 568.213562, 573.247559, 576.264832, 583.249390, 587.241638, 589.260193, 601.402954, 604.321350, 651.331482, 654.336060, 657.295227, 658.371399, 676.248779, 676.440125, 685.366394, 706.454773, 718.443726, 724.658875, 747.433411, 749.259094, 750.368713, 752.143799, 759.419067, 777.180969, 777.452698, 787.408875, 792.828552, 793.534119, 830.445862, 838.103821, 838.400452, 848.121765, 848.419800, 945.128662, 993.454163, 1011.420776, 1124.522095, 1140.541016, 1141.312988, 1159.576660, 1237.496948, 1254.158569, 1254.360474, 1272.269775, 1329.291138, 1350.674561, 1367.024536, 1400.121582, 1400.326050, 1400.934814, 1401.583252, 1421.580200, 1468.017212, 1569.449829, 1597.052124, 1600.911499, 1606.040283, 1606.820435, 1609.961670, 1636.874023, 1652.851929, 1789.961670, 1790.917603, 1794.919800, 1804.925049, 1806.917725, 1808.918823, 1812.911621, 1822.908081, 1826.927856, 1828.901001, 1836.924805, 1844.899902, 2486.298828, 2502.320313, 2518.311768, 2648.397217, 2666.341064

Resultado del análisis utilizando el motor de búsqueda Mascot

Type of search: Sequence Query
Enzyme: Trypsin
Variable modifications: Oxidation (M)
Mass values: Monoisotopic
Protein Mass: Unrestricted
Peptide Mass Tolerance: ± 0.05 Da
Fragment Mass Tolerance: ± 0.6 Da
Max Missed Cleavages : 1
Instrument type: MALDI-TOF-TOF

Mascot Score Histogram

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
Protein scores greater than 86 are significant ($p < 0.05$).
Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Protein Summary Report

Format As: Protein Summary (deprecated) [Help](#)

Significance threshold $p < 0.05$ Max. number of hits: 20

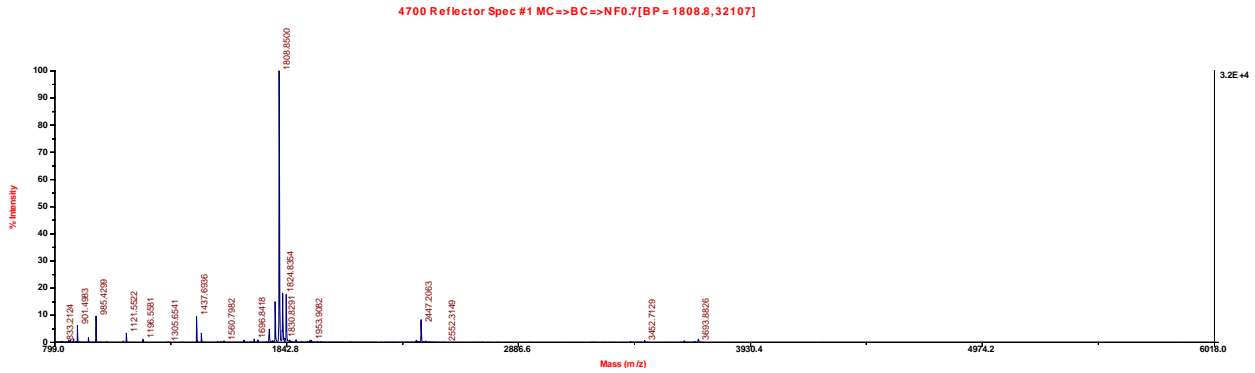
Preferred taxonomy: All entries

[Re-Search All](#) [Search Unmatched](#)

Index

| Accession | Mass | Score | Description |
|----------------------------------|-------|-------|--|
| 1. gi 1417564441 | 37456 | 519 | outer membrane protein Omp38 [<i>Acinetobacter baumannii</i> OIFC143] |
| 2. gi 1375135920 | 37754 | 485 | putative outer membrane protein precursor (OmpA-like) [<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> PHEA-2] |

Espectro de masa correspondiente a la proteína identificada como “outer membrane protein A” de *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606



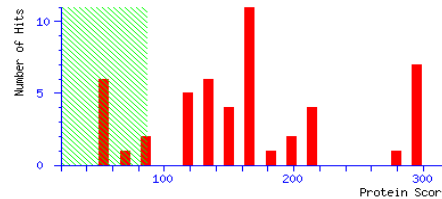
Lista de masas MS (m/z) y MS/MS (m/z) obtenidas experimentalmente:

833.212402, 861.400330, 862.402100, 863.432800, 870.426819, 884.471924, 901.498291, 951.511597, 985.429871
ions(60.027611, 69.011726, 70.033554, 72.050865, 86.064178, 87.044052, 112.060402, 115.053101, 120.065475,
129.084259, 136.054123, 157.062012, 158.045547, 159.086319, 175.091339, 229.129807, 235.094421, 238.004868,
251.126343, 255.100525, 263.088287, 271.101868, 272.085938, 279.040466, 289.128693, 295.108398, 320.090546,
344.130371, 371.120514, 411.120178, 428.151154, 435.103851, 444.158600, 444.369629, 445.189026, 451.051666,
525.158264, 534.112793, 541.037354, 543.114563, 560.133789, 597.856201, 598.099548, 669.143250, 690.145935,
697.148560, 707.090759, 805.177856, 948.805420, 966.487793, 971.017578, 973.196716, 976.303772, 977.423584,
979.406128, 979.985168, 980.574524), 1107.614868, 1121.552246, 1196.558105, 1305.654053, 1311.609619,
1437.693604 ions(44.021622, 60.023125, 70.036255, 72.050125, 86.069237, 112.061707, 116.034950, 129.093491,
130.067535, 131.082001, 136.063080, 157.122894, 158.080902, 159.069687, 175.112244, 185.154800, 186.132950,
187.089096, 196.104111, 214.126602, 227.131195, 243.111771, 244.090775, 245.144760, 262.139435, 272.169708,
278.114075, 284.238922, 293.129791, 315.189148, 327.199432, 333.205505, 343.202301, 371.249817, 400.184296,
407.196106, 431.241180, 448.245880, 485.301758, 487.170074, 521.198914, 532.233276, 547.310608, 597.248962,
614.350952, 620.317749, 626.292297, 644.315002, 661.331177, 777.353699, 807.382874, 824.347595, 953.399841,
960.417480, 990.412170, 1050.337402, 1417.429932, 1427.608643, 1430.239136, 1431.707153, 1431.957031),
1458.839600, 1533.824341, 1548.804321, 1560.798218, 1650.779907, 1679.801636, 1696.841797, 1713.866333,
1762.854370, 1764.869507, 1773.947388, 1778.889282, 1780.874146, 1788.876099, 1790.875977, 1794.879517,
1804.878540, 1806.855103, 1808.849976 ions(18.021984, 27.026783, 28.027208, 30.046310, 43.091751, 44.014267,
60.017464, 70.032570, 72.050484, 74.030037, 84.024055, 86.065918, 87.049667, 88.060333, 100.061775, 102.028854,
112.060257, 114.070175, 115.069557, 116.053162, 120.059471, 129.087723, 130.079056, 131.072739, 132.065033,
133.071594, 141.054443, 157.092346, 158.077026, 159.078400, 169.084671, 170.068604, 171.088409, 172.073547,
175.106293, 183.100815, 185.085724, 186.092896, 187.111130, 189.095215, 191.127838, 197.120544, 198.110260,
199.078751, 200.107010, 201.091980, 204.104950, 210.105072, 211.091599, 213.106155, 214.123657, 215.131744,
216.120636, 217.088608, 219.095261, 226.132111, 227.136414, 228.121918, 230.139328, 231.133865, 240.116058,
241.125168, 242.129761, 243.120392, 246.131058, 254.149994, 255.139709, 256.131287, 257.162598, 258.125641,
259.107697, 260.127441, 270.140991, 272.163605, 276.142456, 283.137390, 284.147919, 285.167236, 288.142731,
295.162811, 297.195068, 298.148987, 299.173859, 300.152771, 301.165222, 302.180176, 306.177979, 311.172668,
314.190002, 316.151306, 318.163239, 319.188080, 326.188843, 327.174072, 328.192505, 329.190674, 333.186646,
334.182831, 339.166260, 340.185333, 342.214600, 343.197174, 344.191315, 346.166687, 347.214264, 354.220856,
355.211517, 356.205444, 357.197968, 359.189117, 361.229492, 368.217743, 371.223846, 373.228088, 375.204041,
381.210419, 382.220764, 383.229126, 385.208801, 386.247955, 387.236938, 396.241791, 399.219910, 401.206116,
403.198242, 404.260712, 411.227173, 413.240021, 414.224548, 417.224884, 425.264954, 426.250580, 428.213287,
429.203308, 432.255554, 439.255707, 440.254944, 442.230225, 443.248566, 453.245697, 457.290161, 458.261780,
462.243683, 467.272491, 468.245941, 470.255646, 475.288452, 476.267487, 484.325165, 485.276306, 486.245300,
491.282501, 496.274353, 497.290405, 499.280548, 503.285980, 504.248169, 508.316467, 510.290894, 512.289124,
514.295410, 518.287659, 527.301819, 543.286011, 554.304077, 555.292542, 561.308350, 569.307739, 571.319092,
572.337280, 579.374939, 590.349487, 594.341736, 599.325684, 600.314575, 601.309692, 617.325684, 618.331482,
619.342896, 625.355591, 626.328308, 634.393127, 636.380920, 640.368958, 644.324890, 646.356934, 656.378723,
657.388733, 662.342712, 670.364136, 674.371887, 689.403992, 700.395996, 718.434998, 729.418640, 735.455688,
739.398743, 747.437805, 750.457886, 757.407104, 770.445007, 775.449097, 785.441956, 792.494019, 798.395935,
803.480408, 814.420288, 821.490051, 832.461243, 845.471558, 846.499390, 861.518677, 863.530090, 873.474365,
928.516296, 932.550720, 942.510376, 943.500000, 946.465149, 960.543457, 977.569214, 982.467651, 999.527954,
1000.511353, 1017.533569, 1034.593262, 1039.525269, 1056.541016, 1057.524048, 1074.530640, 1130.627930,

1138.555542, 1147.668213, 1155.630859, 1157.611938, 1173.577759, 1230.678711, 1248.682617, 1261.703491,
1287.700195, 1288.678589, 1301.657593, 1305.689087, 1416.789185, 1434.678467, 1563.660400, 1650.654419,
1651.541626, 1763.662598, 1764.505493, 1820.845337, 1822.837891, 1824.835449, 1828.838135, 1830.829102,
1836.844849, 1838.827759, 1840.819458, 1845.836060, 1846.806885, 1850.832153, 1852.834839, 1853.837402,
1856.818604, 1862.822144, 1884.870728, 1936.943848, 1946.959229, 1949.972412, 1951.929077, 1953.908203,
1980.913818, 2425.264404, 2429.286865, 2430.279297, 2439.256348, 2446.215576, 2447.206299 ions(28.018869,
30.040798, 41.088985, 55.128498, 70.025047, 84.029060, 110.044350, 112.052094, 129.070801, 157.075577,
175.100952, 183.131302, 211.158188, 233.122955, 258.155884, 261.132080, 324.291534, 339.327698, 342.121338,
357.281769, 360.177002, 432.194427, 437.299042, 445.314972, 448.185730, 458.356110, 472.333008, 473.261169,
490.286926, 543.346680, 560.372070, 609.327820, 609.453125, 610.309326, 610.574707, 626.480103, 627.344910,
627.479370, 693.369019, 707.462219, 710.455933, 720.423279, 738.449768, 755.554016, 781.635620, 805.428833,
824.542480, 825.473267, 841.575378, 842.568665, 894.748718, 922.560730, 939.576660, 957.482605, 957.661255,
958.451843, 1067.638916, 1085.721924, 1197.763184, 1214.750122, 1232.733398, 1298.702759, 1315.719727,
1333.803711, 1478.896118, 1519.821777, 1535.806641, 1552.709351, 1553.832764, 1648.918701, 1649.919922,
1666.871216, 1761.937500, 1779.096558, 1958.063721, 1972.093628, 1972.989136, 1989.167114, 1990.046021,
1991.026245, 1995.179565, 2056.107178, 2072.129883, 2072.824219, 2075.035400, 2091.420898, 2186.074951,
2188.358643, 2290.889160, 2301.559326, 2402.945801, 2423.237549, 2424.447754, 2425.581299, 2426.962158,
2427.443359, 2430.298828, 2434.628174, 2435.514893, 2436.047119, 2436.806152, 2440.336670, 2441.529785,
2444.770264, 2459.224121, 2469.194580, 2482.264160, 2485.206055, 2486.168457, 2504.231934, 2552.314941,
3390.115967, 3437.729248, 3452.712891, 3631.319580, 3677.920898, 3693.882568

Mascot Score Histogram

Protein score is $-10 * \text{Log}(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
Protein scores greater than 86 are significant ($p < 0.05$).
Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Type of search: Sequence Query
Enzyme: Trypsin
Variable modifications: Oxidation (M)
Mass values: Monoisotopic
Protein Mass: Unrestricted
Peptide Mass Tolerance: ± 0.05 Da
Fragment Mass Tolerance: ± 0.6 Da
Max Missed Cleavages : 1
Instrument type: MALDI-TOF-TOF

Protein Summary Report

Format As: Protein Summary (deprecated) [Help](#)

Significance threshold $p < 0.05$ Max. number of hits 20

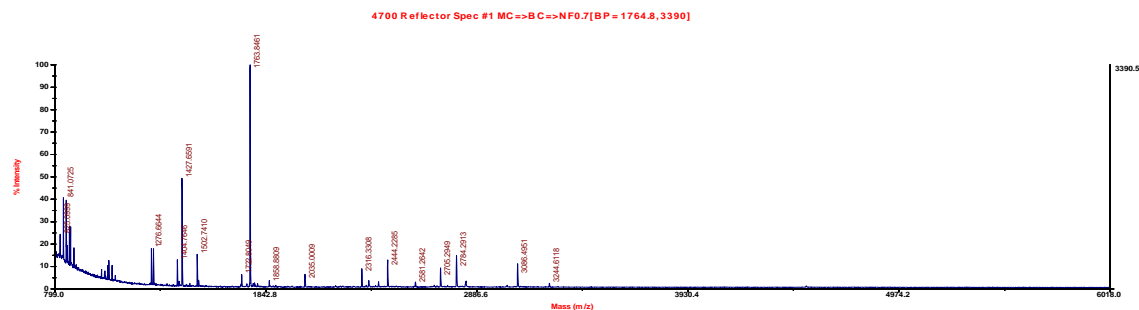
Preferred taxonomy All entries

Re-Search All Search Unmatched

Index

| Accession | Mass | Score | Description |
|---------------------------------|-------|-------|--|
| 1. gi 129307154 | 36939 | 295 | outer membrane protein A [Acinetobacter baumannii] |
| 2. gi 163866826 | 37222 | 294 | outer membrane protein A [Acinetobacter baumannii] |

Espectro de masa correspondiente a la proteína identificada como “putative outer membrane protein” de *Acinetobacter baumannii*



Lista de masas MS (m/z) y MS/MS (m/z) obtenidas experimentalmente:

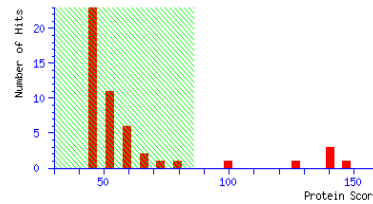
825.099854, 841.072510, 855.046875, 871.018372, 877.039856, 1276.664429, 1286.686523 ions(467.179871, 1084.052246, 1094.003418, 1097.741455), 1404.764648, 1413.656982, 1427.659058, 1502.740967, 1509.777588, 1719.830200, 1722.804932, 1747.841919, 1761.846924, 1763.846069 ions(10.901206, 72.057716, 175.140228, 555.262878, 600.415344, 722.362793, 1345.566895, 1762.491211, 1762.981567), 1779.837402, 1785.827881, 1791.825317, 1801.797607, 1858.880859, 2035.000854, 2316.330811, 2351.053467, 2399.203613, 2444.228516, 2581.264160, 2705.294922, 2784.291260, 2829.382324, 2832.339600, 2833.339600, 3086.495117, 3244.6118

Search Parameters

Type of search: Sequence Query
Enzyme: Trypsin
Variable modifications: Oxidation (M)
Mass values: Monoisotopic
Protein Mass: Unrestricted
Peptide Mass Tolerance : ± 0.06 Da
Fragment Mass Tolerance: ± 0.5 Da
Max Missed Cleavages :

Mascot Score Histogram

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 86 are significant ($p < 0.05$). Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Protein Summary Report

Format As: Protein Summary (deprecated) [Help](#)

Significance threshold $p < 0.05$ Max. number of hits 20

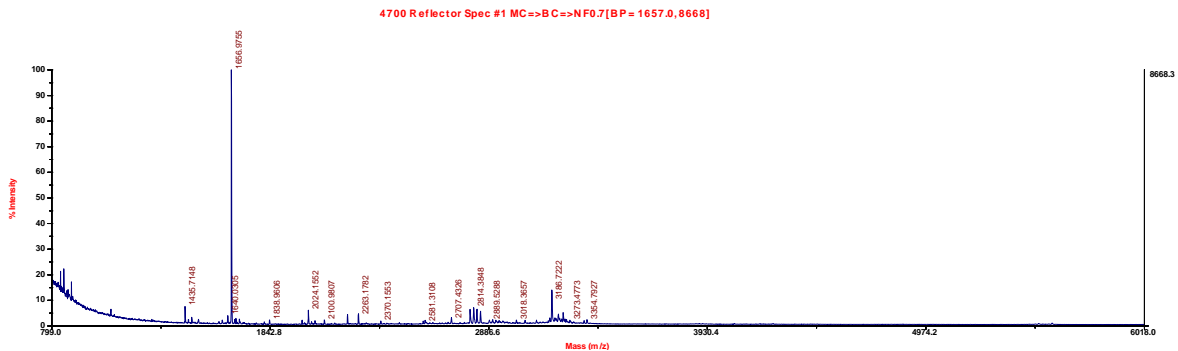
Preferred taxonomy: All entries

Re-Search All Search Unmatched

Index

| Accession | Mass | Score | Description |
|---------------------------------|-------|-------|---|
| 1. gi 172535027 | 25581 | 147 | putative outer membrane protein [Acinetobacter baumannii] |
| 2. gi 126643324 | 27663 | 143 | outer membrane protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978] |

Espectro de masa correspondiente a la proteína identificada como “hypothetical protein ACICU_00960” de *Acinetobacter baumannii* 107m



Lista de masas MS (m/z) y MS/MS (m/z) obtenidas experimentalmente:

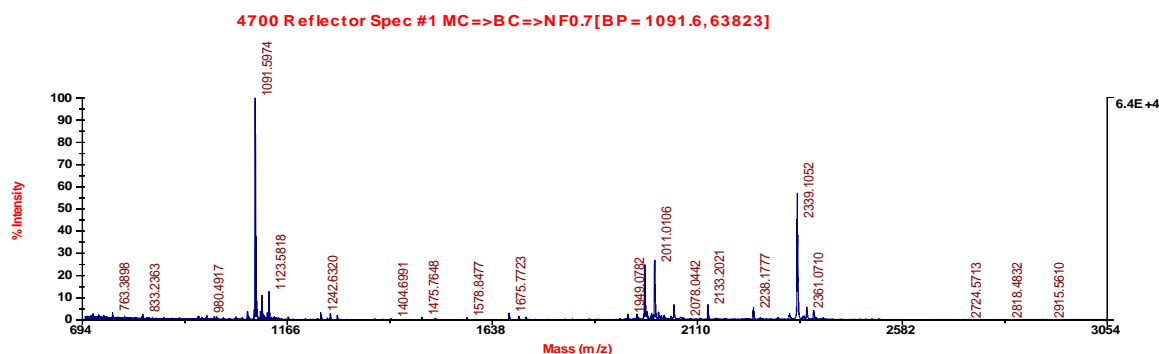
1435.714844, 1638.981323, 1640.030518, 1655.953369, 1656.975464 ions(10.230132, 18.026556, 27.032049, 28.041454, 29.069780, 43.099468, 44.015923, 52.124199, 60.025593, 70.038109, 85.541031, 86.071342, 87.065292, 112.070839, 115.046593, 119.097633, 129.098541, 136.097229, 158.056534, 173.069901, 174.055222, 175.096817, 183.113617,

186.087814, 187.129929, 195.201157, 197.129333, 211.133011, 215.119110, 228.109909, 229.084579, 233.145370,
242.108765, 243.153778, 261.121338, 262.155212, 268.153961, 308.252686, 312.181946, 322.266602, 353.121948,
374.229736, 381.205017, 390.233704, 393.186279, 400.256714, 406.167572, 408.243744, 414.299744, 417.288177,
425.248932, 442.324280, 443.336670, 467.330353, 471.298126, 486.268250, 497.375458, 503.289551, 513.222717,
522.312988, 592.332214, 607.445557, 614.349609, 616.437561, 624.422302, 625.477173, 632.411865, 635.394958,
652.396240, 685.409241, 713.420349, 729.458252, 852.501770, 884.615906, 895.517517, 920.553894, 963.535095,
987.547119, 988.495850, 1005.550537, 1126.660034, 1154.442383, 1215.707764, 1412.705688, 1482.678223,
1500.487671, 1595.892334, 1613.656372, 1636.724243, 1637.169922, 1638.063965, 1638.417969, 1639.562256,
1643.729736, 1648.009521, 1649.700317, 1651.225708, 1652.502441, 1653.536377, 1654.864258, 1672.967041,
1678.953979, 1694.933350, 1838.960571, 1994.030151, 2022.157349, 2024.155151 ions(38.928131, 417.170441,
482.877472, 765.567078, 780.501465, 812.517212, 1100.704102, 1101.636597, 1307.725952, 1325.084595, 1341.826782,
1564.789185, 1604.639893, 1724.342529, 1768.705444, 1811.637939, 1848.869019, 1999.628906, 2004.657959,
2008.664429, 2015.804443, 2018.279419, 2020.499146, 2021.972412, 2022.666992, 2023.984253, 2027.260010),
2040.145752, 2056.147217, 2100.980713, 2211.141602, 2263.178223, 2370.155273, 2572.290771, 2581.310791,
2707.432617, 2796.374512, 2801.403320, 2812.387451, 2814.384766, 2828.390625, 2845.442627, 2889.528809,
2904.499512, 2920.498291, 3018.365723, 3185.659912, 3186.722168, 3201.655273, 3209.674072, 3217.638916,
3222.608887, 3224.643799, 3233.609619, 3240.472900, 3249.595215, 3256.497803, 3273.477295, 3341.784668,
3354.792725

Search Parameters

Type of search: Sequence Query
Enzyme: Trypsin
Variable modifications: Oxidation (M)
Mass values: Monoisotopic
Protein Mass: Unrestricted
Peptide Mass Tolerance: ± 0.08 Da
Fragment Mass Tolerance: ± 0.6 Da
Max Missed Cleavages: 1

Espectro de masa correspondiente a la proteína identificada como “Outer membrane protein W” de *Acinetobacter baumannii* 107m



Lista de masas MS (m/z) y MS/MS (m/z) obtenidas experimentalmente:

714.373230, 718.365662, 731.388611, 743.387878, 763.389771, 833.236328, 980.491699, 1002.499756, 1073.583618, 1074.587402, 1076.585693, 1089.578247, 1091.597412 ions(30.001795, 38.921829, 42.998882, 44.015003, 55.013996, 59.015469, 60.021938, 69.011307, 70.029099, 72.046921, 83.021690, 85.012360, 85.371674, 86.036194, 87.038460, 100.055336, 112.053558, 114.062164, 115.043991, 116.037407, 118.896011, 120.049515, 126.083656, 127.060898, 129.073502, 130.045105, 132.059143, 133.056702, 141.063721, 142.043076, 144.053986, 157.071960, 158.053375, 159.073532, 169.044128, 170.052612, 175.080750, 184.050690, 185.061951, 187.080429, 197.055573, 199.132217, 211.086365, 213.078354, 214.098312, 215.073898, 217.110687, 219.123489, 227.048615, 228.130020, 229.074753, 230.110001, 232.151154, 239.086670, 240.077271, 241.091415, 242.064438, 243.133942, 244.090973, 247.106216, 254.090759, 256.111298, 257.124634, 258.148590, 273.112823, 274.142670, 282.056213, 284.111755, 295.100464, 299.067017, 301.089447, 304.115295, 314.128357, 315.088776, 328.190765, 341.050323, 343.144531, 346.154114, 347.175354, 353.105255, 354.102142, 356.087341, 358.103485, 362.115051, 371.133972, 372.129242, 389.152863, 399.155975, 403.162811, 412.131287, 429.155182, 432.105927, 433.141663, 439.123169, 440.106140, 442.111023, 444.206543, 446.217834, 455.111969, 457.139587, 461.151550, 467.200531, 470.173218, 471.173737, 483.111633, 486.130920, 488.188141, 490.163086, 500.153503, 501.159973, 505.132111, 511.136444, 518.164368, 556.144775, 559.158630, 560.164856, 561.205811, 570.142944, 572.153137, 576.169861, 585.134216, 587.134705, 589.215332, 599.173889, 600.184998, 602.144714, 604.151245, 617.206116, 618.177979, 635.198059, 655.141907, 658.186707, 675.241577, 686.160583, 703.182739, 714.177917, 717.178101, 718.137451, 734.212158, 774.186584, 791.191956, 800.158569, 817.208130, 818.140259, 960.065735, 977.137573, 987.107483, 1072.207397, 1073.103149, 1080.621704, 1081.448364, 1083.175049, 1083.981689, 1085.517822, 1086.139038, 1086.657471, 1087.312988, 1087.904297), 1095.591919, 1103.589600, 1105.580322, 1107.584229, 1113.571777, 1119.586182, 1121.582764, 1123.581787, 1129.556396, 1135.587158, 1167.628418, 1242.631958, 1264.628906, 1280.609009, 1366.734131, 1404.699097, 1475.764771, 1505.752441, 1507.762817, 1559.998779, 1578.847656, 1657.836914, 1674.793091, 1675.772339, 1697.783813, 1698.846924, 1714.830322, 1949.078247, 1970.071167, 1973.105347, 1988.070923 ions(18.019171, 29.044199, 30.046129, 31.131479, 31.994915, 41.080830, 42.075172, 43.080246, 55.155323, 66.187996, 70.025246, 72.043541, 74.031693, 84.033066, 86.067162, 101.055099, 120.047302, 125.046509, 129.081787, 130.052368, 157.043961, 159.050430, 173.046768, 186.076981, 219.117432, 228.174545, 230.101288, 256.135925, 257.143036, 262.121368, 274.137970, 284.122589, 288.186371, 299.157135, 301.139893, 320.177582, 384.235687, 399.201996, 412.289856, 453.273346, 471.278778, 486.313965, 489.271088, 501.290710, 528.280457, 529.196899, 561.289490, 584.324036, 600.282898, 617.353638, 618.344482, 656.264465, 703.459961, 713.376587, 728.338013, 731.418945, 746.411133, 812.346436, 816.363953, 826.568787, 828.414246, 844.466492, 861.432739, 883.342224, 941.546631, 998.424316, 1002.538757, 1045.386963, 1108.405518, 1110.458374, 1124.422119, 1125.464966, 1126.432739, 1132.570801, 1140.916382, 1141.445801, 1142.487549, 1144.491577, 1239.531982, 1255.568115, 1257.526245, 1404.505249, 1409.611694, 1475.554077, 1477.418457, 1647.375122, 1655.468994, 1686.496826, 1704.474609, 1817.488159, 1874.103638, 1950.590698, 1959.191284, 1965.264404, 1968.886719, 1969.732178, 1972.144287, 1972.950317, 1976.543213, 1978.124023, 1979.670410, 1980.515625, 1981.635986, 1982.697266, 1985.396362, 1986.000977, 1986.95910), 1993.044922, 2002.058472, 2004.067993, 2011.010620 ions(14.998650, 18.015779, 22.975960, 27.019194, 28.014103, 29.045856, 30.038624, 39.049526, 41.079239, 44.007023, 63.063988, 70.010902, 72.041283, 84.035858, 86.040916, 101.029510, 102.013283, 112.023499, 120.039909, 129.051895, 147.064392, 159.062805, 171.092285, 175.042053, 177.064178, 184.070160, 186.077148, 202.998169, 205.034134, 209.088654, 214.083710, 218.098160, 228.072433, 229.096848, 234.073898, 239.037674, 241.061279, 242.125183, 245.068558, 245.164459, 256.051666, 257.075378, 259.127319, 262.109863, 274.114746, 276.091461, 284.108551, 297.150513, 299.146210, 301.157928, 302.131012, 316.137787, 319.127319, 320.128723, 330.232178, 333.146637, 342.190552, 343.144135, 355.114624, 356.099579, 370.216187, 373.105743, 390.227081, 412.192139, 413.142395, 414.036743, 414.209747, 415.141022, 431.174652, 432.200409, 449.249146, 453.132416, 455.183044, 467.240631, 471.209259, 472.190491, 483.171661, 483.317596, 489.226990, 489.441223, 501.236115, 505.218445, 519.224060, 520.180237, 530.200195, 533.273254, 548.229187, 560.249512, 561.249451, 574.261719, 578.260193, 584.312439, 594.074036, 594.263123, 596.285828, 597.229126, 600.231506, 601.221863, 611.268799, 612.300903, 614.105530, 617.276733, 618.252747, 629.288086, 643.321838, 658.208984, 670.279175, 673.325623, 674.388123, 675.291992, 687.211975, 693.363953, 703.436096, 706.284790, 707.401123, 713.251343, 730.423157, 731.377197, 744.242188, 746.336914, 758.212830, 762.276489, 764.324341, 776.381470, 786.271484, 804.374939, 816.412781, 826.368774, 828.320496, 835.359192, 844.414307, 856.385742, 861.353516, 872.333435, 873.324829, 875.254578, 875.404785, 877.308777, 887.311340, 890.408691, 899.361938, 901.293152, 917.416016, 956.408691, 963.384644, 974.443665, 990.481689, 1014.352295, 1020.411804, 1030.427002, 1037.466553, 1059.433350, 1076.437012, 1077.397217, 1092.601563, 1093.331909, 1094.470093, 1121.471191, 1140.488159, 1142.397583, 1144.468262, 1146.449585, 1148.497070, 1156.491577, 1157.520020, 1158.424683, 1160.451050, 1164.489380, 1190.459961, 1192.554321, 1207.519653, 1218.477051, 1235.523315, 1246.559937, 1258.533081, 1264.511841, 1271.466064, 1273.487915, 1318.526611,

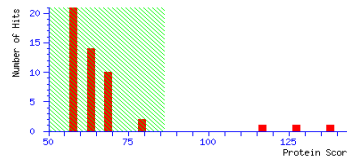
1364.504272, 1374.600830, 1375.511108, 1382.478271, 1387.482666, 1392.548340, 1419.550171, 1420.538086,
1446.520386, 1463.530273, 1464.424561, 1476.513550, 1491.593140, 1492.499512, 1510.478638, 1592.550903,
1619.484619, 1720.560669, 1766.386353, 1767.741333, 1768.601318, 1862.086914, 1863.316895, 1864.197021,
1881.168579, 1973.172607, 1982.949341, 1984.243164, 1985.803467, 1986.527222, 1989.545288, 1990.857544,
1991.487183, 1993.047119, 1994.731201, 1995.476440, 1996.320068, 1998.819092, 2000.038330, 2001.226074,
2002.114868, 2003.008667, 2003.463135, 2005.351440, 2008.341919, 2009.015015), 2020.055176, 2026.035767,
2033.005493, 2048.983643, 2055.053223, 2078.044189, 2133.202148, 2238.177734, 2321.186768, 2337.123291,
2338.096436, 2339.105225 ions(18.018171, 27.018291, 28.017973, 29.031284, 30.033194, 39.052353, 41.081562,
43.089874, 44.074310, 55.110229, 56.141369, 57.166100, 62.810394, 70.028595, 81.252495, 82.246933, 110.041832,
120.048454, 185.074341, 199.078339, 263.123535, 266.181335, 267.115082, 268.215851, 306.112244, 311.155762,
324.138611, 350.218872, 382.141602, 385.156952, 413.190948, 425.255066, 435.140045, 452.214874, 453.206268,
501.162079, 514.253479, 549.201660, 576.312500, 588.278381, 616.294922, 643.442688, 662.049072, 665.331787,
669.300476, 682.368164, 686.375183, 687.216003, 687.372253, 688.252686, 723.312805, 812.319397, 816.320740,
829.481567, 834.394470, 871.355652, 917.410400, 933.659912, 934.414185, 935.419250, 971.526794, 992.496033,
1032.423706, 1055.526489, 1101.443726, 1119.511475, 1142.560913, 1175.641479, 1187.501465, 1200.522705,
1202.399658, 1218.584351, 1243.700195, 1303.527466, 1329.582886, 1346.497559, 1347.612915, 1369.563599,
1386.647827, 1404.654175, 1487.680664, 1492.573486, 1505.664307, 1510.629395, 1630.733887, 1639.654297,
1655.768555, 1657.671631, 1786.672363, 1802.673950, 1804.670044, 1843.662231, 1861.589966, 1971.643066,
1988.895142, 1989.648438, 2058.775879, 2060.618408, 2074.785889, 2076.628906, 2077.748291, 2152.627197,
2318.740479, 2328.933350, 2330.568848, 2332.085205, 2333.623535, 2334.444580, 2335.111084, 2336.228760,
2337.079590), 2351.088379, 2353.099609, 2354.107910, 2355.097412, 2361.071045, 2377.040283, 2383.059082,
2399.042725, 2724.571289, 2818.483154, 2903.440918, 2915.561035

Search Parameters

Type of search: Sequence Query
Enzyme: Trypsin
Variable modifications: Oxidation (M)
Mass values: Monoisotopic
Protein Mass: Unrestricted
Peptide Mass Tolerance: ± 0.08 Da
Fragment Mass Tolerance: ± 0.8 Da
Max Missed Cleavages: 1

Mascot Score Histogram

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
Protein scores greater than 86 are significant ($p < 0.05$).
Protein scores are derived from ion scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Protein Summary Report

Format As: Protein Summary (deprecated) [Help](#)

Significance threshold $p < 0.05$ Max. number of hits 20

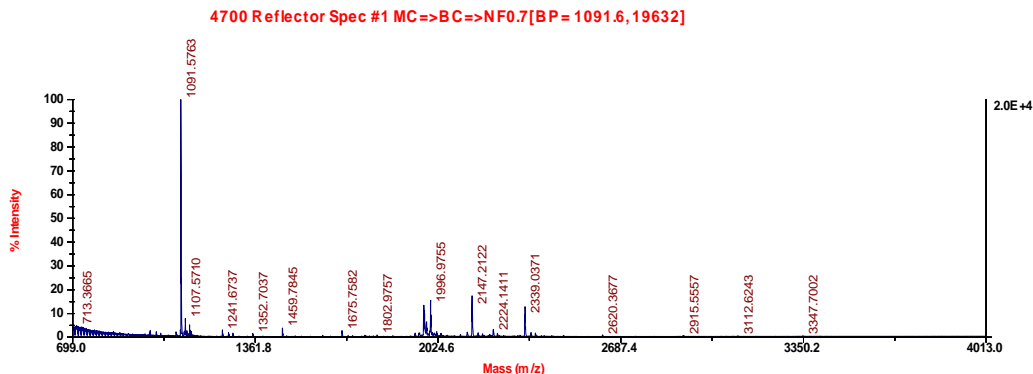
Preferred taxonomy: All entries

[Re-Search All](#) [Search Unmatched](#)

Index

| Accession | Mass | Score | Description |
|---------------------------------|-------|-------|---|
| 1. gi1126640380 | 20084 | 138 | outer membrane protein W [Acinetobacter baumannii ATCC 17978] |
| 2. gi1417548802 | 21199 | 126 | OmpW family protein [Acinetobacter baumannii Naval-18] |

Espectro de masa correspondiente a la proteína identificada como “outer membrane protein W” *Acinetobacter baumannii* 107m.



Lista de masas MS (m/z) y MS/MS (m/z) obtenidas experimentalmente:

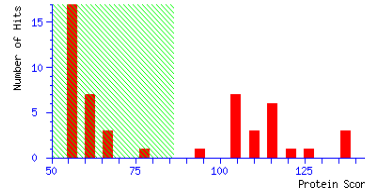
713.366455, 1089.561768, 1091.576294 ions(54.991257, 59.011532, 60.007839, 69.017212, 70.021004, 72.042839, 85.355438, 86.028725, 87.030869, 112.040314, 112.998848, 115.053894, 116.025322, 120.044685, 129.061523, 130.034119, 133.053772, 141.025452, 157.051804, 158.045349, 159.066956, 169.040253, 171.053406, 175.070023, 183.071823, 184.064240, 185.067429, 187.065063, 199.094406, 211.112701, 214.100372, 215.050522, 219.114426, 227.040588, 229.076431, 230.123138, 241.048950, 243.138397, 244.080185, 247.095169, 257.080902, 258.162231, 271.983063, 272.411591, 272.886566, 273.091553, 274.126373, 284.109070, 285.078339, 299.080200, 301.069550, 304.107819, 329.193787, 341.033997, 343.139374, 358.090210, 362.061188, 371.071594, 372.106750, 389.125916, 403.129211, 430.097778, 433.106232, 440.082855, 444.150085, 457.121735, 461.146790, 471.137299, 488.140259, 518.153259, 576.133423, 593.123291, 604.130737, 618.143738, 635.165955, 675.159485, 686.109070, 703.119385, 734.125732, 774.173157, 791.159302, 817.143799, 1073.196777, 1076.051392, 1083.750732, 1084.308838, 1086.246582, 1087.664795, 1088.155518, 1088.543457, 1088.962158, 1089.862915, 1095.572998, 1107.571045, 1113.558472, 1123.567749, 1241.673706, 1264.614990, 1280.623291, 1352.703735, 1459.784546, 1475.784424, 1505.725952, 1605.852173, 1675.758179, 1697.764038, 1714.786133, 1759.009155, 1802.975708, 1940.984009, 1954.072388, 1957.078979, 1964.001343, 1970.095581, 1972.082153, 1975.080811, 1979.042969, 1980.029541, 1982.010864, 1986.061035, 1987.079590, 1988.086914, 1994.069458, 1996.030762, 1996.975464 ions(15.037741, 18.020630, 28.019676, 29.033564, 30.037964, 31.408548, 31.497841, 34.802444, 41.513226, 49.274990, 55.107330, 61.634598, 70.021080, 76.736748, 86.046219, 95.044296, 101.033501, 108.520294, 120.053482, 129.068359, 165.051559, 175.074966, 186.020935, 190.055527, 212.172348, 218.086334, 228.070740, 234.085220, 259.073334, 285.126160, 300.141388, 316.086884, 317.178223, 355.032440, 386.170807, 409.208008, 413.122223, 427.121124, 431.141632, 438.253387, 448.155182, 449.206879, 483.331848, 495.219910, 501.254364, 514.230530, 530.203735, 542.199829, 594.219360, 601.292603, 610.396606, 612.330627, 629.193726, 629.386780, 640.355469, 655.213196, 656.438843, 730.301819, 732.236328, 763.243103, 775.935974, 776.327637, 777.342224, 778.329041, 779.332092, 786.203613, 787.363953, 804.224670, 805.528931, 844.417908, 845.371765, 846.281372, 873.371521, 876.414490, 878.350037, 885.397095, 890.371826, 893.382446, 899.394348, 903.272705, 933.423767, 958.333557, 959.383057, 1006.473022, 1037.405762, 1044.824341, 1077.437012, 1090.411011, 1093.854248, 1094.488770, 1107.507935, 1110.409180, 1126.442993, 1127.437256, 1141.611328, 1142.492310, 1144.483521, 1191.461060, 1201.380005, 1206.488403, 1256.571167, 1257.521118, 1264.613647, 1343.595215, 1351.399658, 1359.605713, 1361.477295, 1364.465698, 1378.536865, 1399.593750, 1404.727783, 1406.537720, 1432.569580, 1433.691528, 1434.800049, 1449.521606, 1454.625488, 1476.657227, 1496.615967, 1511.609863, 1519.684082, 1520.837769, 1521.604004, 1575.152954, 1578.621704, 1605.506226, 1632.704224, 1647.631592, 1735.494507, 1743.374512, 1750.840942, 1752.129761, 1754.246216, 1763.310181, 1770.871460, 1778.128540, 1779.679443, 1781.347900, 1817.761353, 1837.519897, 1849.464600, 1865.233765, 1868.407227, 1880.033203, 1936.605957, 1940.738403, 1959.004150, 1966.429932, 1967.279419, 1970.546387, 1971.185547, 1975.686646, 1976.419312, 1977.606689, 1978.058594, 1978.829590, 1980.333374, 1982.010010, 1982.625122, 1984.713623, 1985.503906, 1986.282227, 1987.525269, 1987.935669, 1989.742065, 1990.288696, 1990.737305, 1991.134521, 1991.594360, 1992.299927, 1993.130249, 1994.358887, 1994.791870, 1995.830811), 2003.096436, 2010.046387, 2013.034058, 2014.038452, 2018.989624, 2034.947510, 2057.983154, 2106.075439, 2129.223389, 2130.231689, 2147.212158 ions(28.011581, 29.037945, 31.041033, 43.099373, 55.132465, 64.324722, 86.046295, 110.015846, 175.015594, 185.117981, 217.114655, 225.039093, 227.166565, 241.022415, 243.085220, 253.070679, 288.115234, 340.123840, 401.198547, 408.166229, 426.127930, 434.358704, 462.170624, 497.140381, 497.300446, 513.233582, 514.289612, 516.184387, 627.375793, 677.404236, 697.958435, 751.543396, 778.280640, 799.424255, 800.589600, 995.115295, 1007.497070, 1007.664124, 1023.420898, 1023.922791, 1024.291138, 1024.515625, 1025.356323, 1121.514038, 1128.544189, 1138.598511, 1139.575073, 1140.388550, 1149.527954, 1242.668823, 1260.559570, 1278.776245, 1302.747070, 1313.580566, 1314.545044, 1316.663940, 1325.502808, 1330.647583, 1331.622314, 1347.771484, 1348.594971, 1357.633179, 1375.526001, 1376.655518, 1389.661987, 1432.627197, 1434.359131, 1449.156006, 1451.051147, 1456.691162, 1472.466431, 1474.686279, 1503.635010, 1505.487061, 1518.824585, 1520.599121, 1567.936523, 1570.672363, 1580.549805, 1586.093872, 1586.775269, 1587.260498, 1589.158081, 1670.029785, 1698.344971, 1699.800659, 1702.371094, 1718.261841, 1729.802612, 1747.926147, 1748.620605, 1813.913330, 1814.490112, 2116.397949, 2124.689453, 2125.997803, 2126.921875, 2127.857910, 2130.499512, 2135.994141, 2137.211670, 2138.802002, 2140.460938, 2142.119141, 2142.891602, 2143.312500, 2144.392578, 2146.053711), 2169.195557, 2185.190430, 2211.144287, 2224.141113, 2239.166016, 2322.157959, 2339.037109, 2361.035156, 2376.991211, 2620.367676, 2911.477783, 2914.505859, 2915.555664, 3112.624268, 3347.700195

Search Parameters

Type of search: Sequence Query
Enzyme: Trypsin
Variable modifications: Oxidation (M)
Mass values: Monoisotopic
Protein Mass: Unrestricted
Peptide Mass Tolerance: ± 0.08 Da
Fragment Mass Tolerance: ± 0.6 Da
Max Missed Cleavages : 1

Mascot Score Histogram

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
Protein scores greater than 86 are significant ($p < 0.05$).
Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Protein Summary Report

Format As: Protein Summary (deprecated) [Help](#)

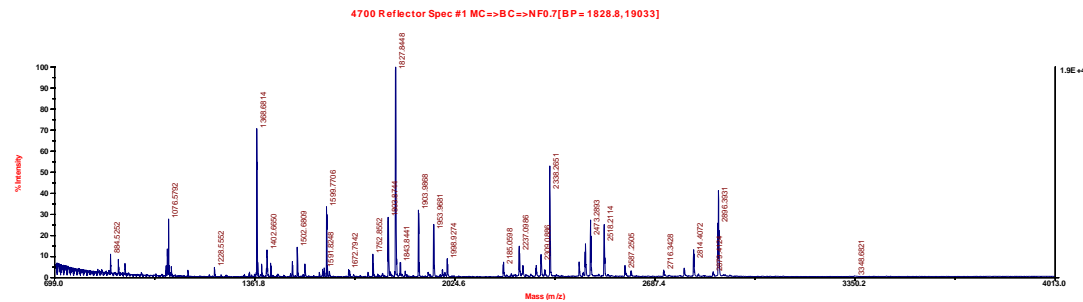
Significance threshold $p <$ 0.05 Max. number of hits 20

Preferred taxonomy: All entries

Index

| Accession | Mass | Score | Description |
|----------------------------------|-------|-------|--|
| 1. gi 1421655087 | 21641 | 137 | OmpW family protein [Acinetobacter baumannii Naval-72] |
| 2. gi 1424061385 | 21657 | 137 | hypothetical protein W9K_02498 [Acinetobacter baumannii Ab33333] |

Espectro de masa correspondiente a la proteína identificada como “TonB-dependent siderophore receptor” de *Acinetobacter baumannii*.



Lista de masas MS (m/z) y MS/MS (m/z) obtenidas experimentalmente:

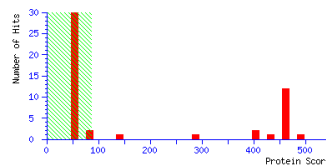
884.525208, 1072.548950, 1076.579224 ions(29.998697, 60.014717, 70.030846, 82.016068, 84.036469, 85.378319, 86.061043, 87.024010, 95.056862, 101.036407, 112.053207, 118.869408, 120.035782, 129.052719, 136.025894, 143.061951, 147.087540, 171.056534, 174.778656, 175.062851, 183.111206, 201.111649, 211.102417, 215.021118, 216.109634, 231.990494, 233.086502, 236.041214, 241.058014, 243.123062, 261.079742, 267.078644, 286.102295, 295.076752, 303.090881, 315.112518, 318.082245, 325.104645, 327.082214, 331.101807, 348.099792, 392.112244, 412.101807, 431.151367, 461.152863, 465.180573, 467.153900, 490.162476, 500.071777, 518.167725, 525.207947, 535.165283, 611.134155, 612.168213, 632.153503, 633.130432, 650.169373, 665.212891, 681.205505, 697.237732, 725.218689, 747.201477, 760.222351, 761.230835, 778.231384, 812.208069, 876.226318, 908.232910, 925.244019, 1072.327393, 1074.549927, 1074.884033, 1076.175903, 1076.703979, 1228.555176, 1368.681396 ions(27.062590, 27.880123, 38.923302, 43.123959, 44.013885, 46.016899, 55.205585, 70.026680, 71.001060, 71.578186, 72.042618, 86.022766, 87.026001, 112.044884, 116.012993, 120.046310, 128.838638, 130.040939, 136.043655, 157.987442, 158.644089, 159.083969, 170.023621, 174.041183, 175.078568, 181.166611, 182.680145, 185.055557, 186.087860, 187.030029, 199.094437, 205.054184, 215.099915, 223.556015, 224.108597, 227.090515, 228.126953, 230.107620, 238.086502, 239.045135, 240.034286, 241.091324, 252.060379, 253.971680, 271.070740, 272.063934, 278.106628, 289.114441, 320.073700, 329.059631, 348.138977, 419.132782, 458.079163, 475.191925, 490.126953, 518.181946, 563.048828, 589.243713, 600.496704, 671.252625, 688.205200, 700.275330, 778.158875, 791.288269, 795.150452, 848.221497, 849.300476, 868.260559, 894.250977, 990.142761, 1078.158691, 1153.098511, 1153.703979, 1154.174072, 1155.535034, 1350.778442, 1355.437744, 1357.169189, 1358.836426, 1360.299805, 1361.068359, 1361.708008,

1362.929443, 1363.409912, 1363.930542, 1364.678467, 1365.183228, 1365.503540, 1366.324951, 1366.682373, 1367.091553, 1367.694946, 1368.526489), 1384.679199, 1400.673462, 1402.665039, 1414.690430, 1486.692505, 1502.680908, 1527.804321, 1586.846680, 1591.824829, 1599.770630 ions(18.031258, 27.036287, 33.014366, 60.005463, 69.944916, 70.026909, 72.042809, 73.048798, 86.054329, 88.014061, 101.045555, 112.040710, 120.042091, 123.550072, 129.033020, 169.062210, 174.169830, 175.073242, 185.081100, 185.724030, 185.844543, 186.056412, 189.081253, 191.112244, 200.008255, 200.174866, 205.133820, 207.112259, 212.947754, 213.068146, 214.099167, 215.067917, 216.070450, 219.983414, 228.100052, 230.145203, 240.082672, 262.126373, 286.061493, 303.144196, 312.124329, 375.170990, 382.084778, 402.227570, 440.122192, 465.225739, 500.235413, 535.302063, 548.243103, 596.758667, 597.261169, 603.280579, 605.235779, 761.320496, 791.307800, 957.426575, 962.255859, 1052.396240, 1526.755249, 1578.172852, 1579.436401, 1592.480835, 1594.141235, 1594.864990, 1595.261108, 1595.686523, 1596.519409, 1596.927612, 1597.525879, 1598.833740), 1672.794189, 1752.855225, 1803.874390, 1827.844849 ions(15.005728, 18.013817, 27.016703, 39.055588, 60.023266, 65.192795, 70.028793, 72.032585, 85.717148, 86.057335, 112.054016, 120.063408, 129.058762, 130.061447, 136.052597, 157.038589, 158.949509, 159.064407, 174.690704, 175.080536, 183.999985, 193.004272, 215.152222, 216.076385, 218.315247, 218.997101, 226.132660, 230.040634, 233.177048, 244.005661, 254.093124, 256.129791, 257.040131, 272.168976, 274.185608, 314.052643, 314.220276, 331.198456, 413.063782, 491.206909, 513.195435, 551.263489, 662.199951, 706.324341, 777.262390, 795.332153, 848.366882, 873.267944, 877.150940, 890.292297, 891.026428, 891.291992, 892.455383, 908.029724, 908.369263, 961.342285, 1006.277771, 1006.467896, 1023.372742, 1034.325195, 1049.329346, 1189.451294, 1192.347900, 1207.248047, 1208.369873, 1209.146240, 1209.389160, 1210.254150, 1409.304932, 1820.837769, 1822.808838, 1824.488525, 1825.326782, 1826.302612, 1828.556030), 1843.844116, 1903.986816, 1953.968140, 1982.933838, 1998.927368, 2185.059814, 2237.098633, 2249.166748, 2293.099365, 2309.088623, 2322.252197, 2338.265137 ions(11.535520, 18.020309, 27.023842, 27.234468, 27.953136, 29.034155, 30.041241, 34.794750, 41.067909, 43.062805, 44.079613, 46.210983, 47.916042, 48.495338, 49.282665, 49.902988, 51.086689, 57.142590, 59.118248, 66.098877, 67.143814, 70.030983, 71.042419, 72.059540, 84.021820, 86.065262, 101.047920, 112.049370, 113.751518, 120.064880, 129.091644, 158.057678, 169.047729, 173.135406, 174.979675, 175.107483, 183.140366, 200.128876, 200.675690, 201.086243, 211.139633, 214.106201, 215.059647, 219.106186, 229.818283, 232.133499, 244.165527, 255.700180, 258.833771, 266.167450, 271.152130, 283.152985, 298.164124, 324.251617, 325.129456, 328.189941, 347.182709, 348.203400, 361.217529, 370.128143, 394.359070, 394.862518, 395.276794, 400.144653, 415.177094, 417.828644, 445.195648, 446.295715, 448.908905, 475.247681, 481.290436, 486.308258, 509.400238, 512.180603, 512.316101, 527.179077, 529.334473, 542.439636, 557.178528, 564.334656, 603.311401, 625.197815, 642.452698, 713.241089, 713.485229, 718.464233, 729.526306, 746.441956, 757.435364, 768.351868, 774.391785, 775.355225, 781.531860, 783.498596, 805.662720, 817.371765, 817.646484, 818.022095, 826.517273, 885.348694, 898.529419, 901.593262, 908.389954, 955.594910, 992.539978, 1019.688782, 1034.572266, 1036.688110, 1039.565430, 1042.706055, 1051.711792, 1147.447388, 1150.745728, 1167.680420, 1173.461426, 1175.595459, 1188.626953, 1221.649170, 1232.658936, 1271.699341, 1272.570068, 1273.770996, 1285.509033, 1301.629639, 1302.742676, 1318.722778, 1336.695801, 1364.037476, 1421.889282, 1422.637817, 1423.788086, 1432.748535, 1463.803345, 1496.512085, 1520.004883, 1522.786865, 1544.626343, 1580.409668, 1592.785767, 1593.911377, 1649.354614, 1664.034180, 1697.265259, 1753.081177, 1791.920532, 1845.984863, 1872.053345, 1990.843262, 2029.683594, 2316.395020, 2318.113281, 2324.920410, 2325.704102, 2327.079346, 2328.261475, 2330.173584, 2330.935547, 2331.561523, 2333.842041, 2335.385498, 2337.380127), 2435.350830, 2456.273926, 2473.289307, 2518.211426, 2587.250488, 2608.301025, 2716.342773, 2783.407959, 2814.407227, 2879.412354, 2896.393066, 3348.682129

Type of search : Sequence Query
Enzyme: Trypsin
Variable modifications: Oxidation (M)
Mass values: Monoisotopic
Protein Mass: Unrestricted
Peptide Mass Tolerance: ± 0.08 Da
Fragment Mass Tolerance: ± 0.6 Da
Max Missed Cleavages : 1

Mascot Score Histogram

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
Protein scores greater than 86 are significant ($p < 0.05$).
Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Protein Summary Report

Format As: Protein Summary (deprecated) [Help](#)

Significance threshold $p < 0.05$ Max. number of hits: 20

Preferred taxonomy: All entries

[Re-Search All](#) [Search Unmatched](#)

Index

| Accession | Mass | Score | Description |
|----------------------------------|-------|-------|--|
| 1. gi 1417547805 | 85394 | 491 | TonB-dependent siderophore receptor [Acinetobacter baumannii Naval-18] |
| 2. gi 3328951725 | 85361 | 472 | TonB-dependent siderophore receptor [Acinetobacter baumannii 6013150] |

ANEXO G

Lista de IDs de los genes codificantes asociadas con factores de virulencia de la cepa en estudio *A. baumannii* 107m y las cepas ACICU, AB0057, ATCC 19606 y ATCC17978

ID de genes codificantes del sistema de pili tipo I, operón (*csu*) en cepas de *A. baumannii*

| GEN | AB0057 | ACICU | ATCC19606 | 17978 | 107m |
|--------------------------------|-----------|-------------|------------------|----------|-----------------------------------|
| <i>CsuA/B</i> | AB57_2570 | ACICU_02420 | HMPREF0010_00109 | A1S_2218 | Falta el código de identificación |
| <i>IS30 family transposase</i> | --- | ACICU_02419 | ---- | ----- | ----- |
| <i>CsuA</i> | AB57_2569 | ACICU_02418 | HMPREF0010_00110 | A1S_2217 | Falta el código de identificación |
| <i>CsuB</i> | AB57_2568 | ACICU_02417 | HMPREF0010_00111 | A1S_2216 | Falta el código de identificación |
| <i>PapD</i> | AB57_2567 | ACICU_02416 | HMPREF0010_00112 | A1S_2215 | Falta el código de identificación |
| <i>PapC</i> | AB57_2566 | ACICU_02415 | HMPREF0010_00113 | A1S_2214 | Falta el código de identificación |
| <i>CsuE;</i> | AB57_2565 | ACICU_02414 | HMPREF0010_00114 | A1S_2213 | Falta el código de identificación |

*Los genes que hacen parte del operón *csu* se identificaron en *A. baumannii* 107m, sin embargo aún no se han nombrado con un código específico

ID de genes codificantes del sistema de pili tipo I, operón (*pap*) en cepas de *A. baumannii*

| GEN | AB0057 | ACICU | ATCC19606 | 17978 | 107m |
|-------------|-----------|-------------|------------------|----------|--------------|
| <i>fimA</i> | AB57_2004 | ACICU_01810 | HMPREF0010_00600 | A1S_1507 | ABIBUN_09715 |
| <i>papC</i> | AB57_2005 | ACICU_01811 | HMPREF0010_00599 | A1S_1508 | ABIBUN_09720 |
| <i>papD</i> | AB57_2006 | ACICU_01812 | HMPREF0010_00598 | A1S_1509 | ABIBUN_09725 |
| <i>fimA</i> | AB57_2007 | ACICU_01813 | HMPREF0010_00597 | A1S_1510 | ABIBUN_09730 |

ID de genes codificantes del sistema de pili tipo IV, en cepas de *A. baumannii*

| GEN | AB0057 | ACICU | ATCC19606 | 17978 | 107m |
|------------------|------------|-------------|------------------|----------|--------------|
| <i>pilR</i> | 2AB57_0323 | ACICU_00257 | HMPREF0010_01993 | A1S_0234 | ABIBUN_01307 |
| <i>pilS</i> | AB57_0324 | ACICU_00258 | HMPREF0010_01992 | A1S_0235 | ABIBUN_01312 |
| <i>pulO/pilD</i> | AB57_0408 | ACICU_00343 | HMPREF0010_01908 | A1S_0327 | ABIBUN_01752 |
| <i>pulF/pilC</i> | AB57_0409 | ACICU_00344 | HMPREF0010_01907 | A1S_0328 | ABIBUN_01757 |
| <i>pilB</i> | AB57_0410 | ACICU_00345 | HMPREF0010_01906 | A1S_0329 | ABIBUN_01762 |
| | AB57_0686 | ACICU_00586 | HMPREF0010_01672 | A1S_0582 | ABIBUN_03109 |

| | | | | | |
|-----------------------|-----------|-------------|------------------|----------|--------------|
| <i>comEA</i> | | | | | |
| <i>comL</i> | AB57_0888 | ACICU_00793 | HMPREF0010_01337 | A1S_0840 | ABIBUN_04334 |
| <i>pilU</i> | AB57_0944 | ACICU_00847 | HMPREF0010_01390 | A1S_0896 | ABIBUN_05017 |
| <i>pilT</i> | AB57_0945 | ACICU_00848 | HMPREF0010_01391 | A1S_0897 | ABIBUN_05022 |
| <i>pilZ</i> | AB57_1804 | ACICU_01606 | HMPREF0010_00799 | A1S_1559 | ABIBUN_08670 |
| <i>ComEC/Rec2</i> | No esta | ACICU_02854 | HMPREF0010_02126 | A1S_2610 | ABIBUN_14488 |
| <i>ChpA</i> | AB57_3311 | ACICU_03059 | HMPREF0010_02812 | A1S_2811 | ABIBUN_15493 |
| <i>pilJ</i> | AB57_3312 | ACICU_03060 | HMPREF0010_02811 | A1S_2812 | ABIBUN_15498 |
| <i>pilI</i> | AB57_3313 | ACICU_03061 | HMPREF0010_02810 | A1S_2813 | ABIBUN_15503 |
| <i>pilH</i> | AB57_3314 | ACICU_03062 | HMPREF0010_02809 | A1S_2814 | ABIBUN_15508 |
| <i>pilG</i> | AB57_3315 | ACICU_03063 | HMPREF0010_02808 | A1S_2815 | ABIBUN_15513 |
| <i>pilE</i> | AB57_3620 | ACICU_03365 | HMPREF0010_02543 | A1S_3165 | ABIBUN_16998 |
| <i>pilE</i> | AB57_3619 | ACICU_03364 | HMPREF0010_02544 | A1S_3166 | ABIBUN_17003 |
| <i>PilY1/pilC</i> | AB57_3621 | ACICU_03366 | HMPREF0010_02542 | A1S_3167 | ABIBUN_17008 |
| <i>pilX</i> | AB57_3622 | ACICU_03367 | HMPREF0010_02541 | | ABIBUN_17013 |
| <i>pilW</i> | AB57_3623 | ACICU_03368 | HMPREF0010_02540 | A1S_3168 | ABIBUN_17018 |
| <i>pilV</i> | AB57_3624 | ACICU_03369 | HMPREF0010_02539 | No está | ABIBUN_17023 |
| <i>pilT fimT/fimU</i> | AB57_3625 | ACICU_03370 | HMPREF0010_02538 | No está | ABIBUN_17028 |
| <i>pilA</i> | No esta | ACICU_03380 | No esta | A1S_3177 | ABIBUN_17073 |
| <i>HofQ/pilQ</i> | | | | | |
| | AB57_3644 | ACICU_03390 | HMPREF0010_02518 | A1S_3191 | ABIBUN_17123 |
| <i>pilP</i> | AB57_3645 | ACICU_03391 | HMPREF0010_02517 | A1S_3192 | ABIBUN_17128 |
| <i>ComO (pilO)</i> | | | | | |
| | AB57_3646 | ACICU_03392 | HMPREF0010_02516 | A1S_3193 | ABIBUN_17133 |
| <i>pilN</i> | AB57_3647 | ACICU_03393 | HMPREF0010_02515 | A1S_3194 | ABIBUN_17138 |
| <i>pilM</i> | AB57_3648 | ACICU_03394 | HMPREF0010_02514 | A1S_3193 | ABIBUN_17143 |

**ID de genes codificantes encargados de la biosíntesis del sideróforo acinetobactin
en cepas de *A. baumannii***

| GEN | AB0057 | ACICU | ATCC19606 | 17978 | 107m |
|-----------------------------|-----------|-------------|------------------|----------|--------------|
| <i>basJ</i> | AB57_2802 | ACICU_02570 | HMPREF0010_02312 | A1S_2372 | ABIBUN_13511 |
| <i>basI</i> | AB57_2803 | ACICU_02571 | HMPREF0010_02311 | A1S_2373 | ABIBUN_13516 |
| <i>bash</i> | AB57_2804 | ACICU_02572 | HMPREF0010_02310 | A1S_2374 | ABIBUN_13521 |
| <i>barb</i> | AB57_2805 | ACICU_02573 | HMPREF0010_02309 | A1S_2375 | ABIBUN_13526 |
| <i>barA</i> | AB57_2806 | ACICU_02574 | HMPREF0010_02308 | A1S_2378 | ABIBUN_13531 |
| <i>hypothetical protein</i> | | | | | ABIBUN_13536 |
| | AB57_2807 | ACICU_02575 | HMPREF0010_02307 | | |
| <i>basG</i> | AB57_2808 | ACICU_02576 | HMPREF0010_02306 | A1S_2379 | ABIBUN_13541 |
| <i>basF</i> | AB57_2809 | ACICU_02577 | HMPREF0010_02305 | A1S_2380 | ABIBUN_13546 |
| <i>basE/entE</i> | AB57_2810 | ACICU_02578 | HMPREF0010_02304 | A1S_2381 | ABIBUN_13551 |
| <i>basD/entF</i> | AB57_2811 | ACICU_02579 | HMPREF0010_02303 | A1S_2383 | ABIBUN_13556 |
| <i>basC/iucD</i> | AB57_2812 | ACICU_02580 | HMPREF0010_02302 | A1S_2384 | ABIBUN_13561 |
| <i>bauA</i> | AB57_2813 | ACICU_02581 | HMPREF0010_02301 | A1S_2385 | ABIBUN_13566 |
| <i>bauB/fatB</i> | AB57_2814 | ACICU_02582 | HMPREF0010_02300 | A1S_2386 | ABIBUN_13571 |
| <i>bauE</i> | AB57_2815 | ACICU_02583 | HMPREF0010_02299 | A1S_2387 | ABIBUN_13576 |
| <i>bauC</i> | AB57_2816 | ACICU_02584 | HMPREF0010_02298 | A1S_2389 | ABIBUN_13581 |

| | | | | | |
|-----------------------------|-----------|-------------|------------------|----------|--------------|
| <i>bauD</i> | AB57_2817 | ACICU_02585 | HMPREF0010_02297 | A1S_2389 | ABIBUN_13586 |
| <i>hypothetical protein</i> | AB57_2818 | ACICU_02586 | HMPREF0010_02296 | | |
| <i>basB</i> | AB57_2819 | ACICU_02587 | HMPREF0010_02295 | A1S_2390 | ABIBUN_13591 |
| | | | | | ABIBUN_13596 |
| <i>basA</i> | AB57_2820 | ACICU_02588 | HMPREF0010_02294 | A1S_2391 | |
| <i>bauF</i> | AB57_2822 | ACICU_02589 | HMPREF0010_02293 | A1S_2392 | ABIBUN_13601 |

ID del grupo de genes donde se encuentra el gen *entA*, necesario para la completa biosíntesis del sideróforo acinetobactin en cepas de *A. baumannii*

| GEN | AB0057 | ACICU | ATCC19606 | 17978 | 107m |
|-----------------|-----------|-------------|------------------|---------|--------------|
| <i>modE</i> | AB57_1979 | ACICU_01786 | HMPREF0010_00624 | No esta | ABIBUN_09595 |
| <i>modA</i> | AB57_1980 | ACICU_01787 | HMPREF0010_00623 | No esta | ABIBUN_09600 |
| <i>modB</i> | AB57_1981 | ACICU_01788 | HMPREF0010_00622 | No esta | ABIBUN_09605 |
| <i>modC</i> | AB57_1982 | ACICU_01789 | HMPREF0010_00621 | No esta | ABIBUN_09610 |
| <i>entA</i> | AB57_1983 | ACICU_01790 | HMPREF0010_00620 | No esta | ABIBUN_09615 |
| <i>entB</i> | AB57_1984 | ACICU_01791 | HMPREF0010_00619 | No esta | ABIBUN_09620 |
| <i>Fe2+/Zn2</i> | AB57_1985 | ACICU_01792 | HMPREF0010_00618 | No esta | ABIBUN_09625 |

ID del grupo de genes putativos codificantes de un sideróforo putativo en cepas de *A. baumannii*

| GEN | AB0057 | ACICU | ATCC19606 | 17978 | 107m |
|---------------------------------|-----------|-------------|------------------|----------|--------------|
| <i>lucA</i> | AB57_1869 | ACICU_01672 | HMPREF0010_00734 | A1S_1647 | ABIBUN_09000 |
| <i>lucD</i> | AB57_1870 | ACICU_01673 | HMPREF0010_00733 | A1S_1648 | ABIBUN_09005 |
| <i>MSF</i> | AB57_1871 | ACICU_01674 | HMPREF0010_00732 | A1S_1649 | ABIBUN_09010 |
| <i>lucA_lucC</i> | AB57_1872 | ACICU_01675 | HMPREF0010_00731 | A1S_1651 | ABIBUN_09015 |
| <i>lucA_lucC</i> | AB57_1873 | ACICU_01676 | HMPREF0010_00730 | A1S_1652 | ABIBUN_09020 |
| <i>FhuF proteína hipotética</i> | AB57_1874 | ACICU_01677 | HMPREF0010_00729 | A1S_1653 | ABIBUN_09025 |
| <i>MenG</i> | AB57_1875 | ACICU_01678 | HMPREF0010_00728 | A1S_1654 | ABIBUN_09030 |
| <i>TonB-siderophor</i> | AB57_1876 | ACICU_01679 | HMPREF0010_00727 | A1S_1655 | ABIBUN_09035 |

ID de los genes codificantes de receptores de hierro

| GEN | AB0057 | ACICU | ATCC19606 | 17978 | 107m |
|--|-----------|-------------|--------------------------------|----------|--------------|
| FepA | AB57_1059 | ACICU_00942 | HMPREF0010_01517 F911_02955 | no esta | ABIBUN_05517 |
| Bfr | AB57_3631 | ACICU_03376 | F911_00533 | A1S_3174 | ABIBUN_17058 |
| Bacterioferritin (cytochrome b1) | AB57_3632 | ACICU_03377 | HMPREF0010_02531 | A1S_3175 | ABIBUN_17063 |
| TonB (hypothetical protein- Periplasmic protein TonB, links inner and outer membranes) | AB57_3480 | ACICU_03228 | F911_00684 | A1S_3032 | ABIBUN_16306 |
| Outer membrane receptor proteins, mostly Fe transport- | AB57_3329 | ACICU_03077 | HMPREF0010_02794 | A1S_2829 | ABIBUN_15583 |
| Outer membrane receptor proteins, mostly Fe transport –TonB | AB57_3396 | ACICU_03142 | HMPREF0010_02730 | A1S_2892 | ABIBUN_15888 |
| TonB-dependent siderophore receptor (EXBD-like) | AB57_2408 | ACICU_02279 | HMPREF0010_00262 | A1S_2080 | ABIBUN_11980 |
| | AB57_1827 | ACICU_01629 | HMPREF0010_00776 | A1S_1603 | ABIBUN_08785 |
| <i>ExbD/ToIR</i> | AB57_1828 | ACICU_01630 | HMPREF0010_00775 | A1S_1604 | ABIBUN_08790 |
| <i>biopolymer transport protein</i> | AB57_1829 | ACICU_01631 | HMPREF0010_00774 | A1S_1605 | ABIBUN_08795 |
| <i>TonB</i> | AB57_1830 | ACICU_01632 | HMPREF0010_00773 | | ABIBUN_08800 |
| <i>TonB</i> | AB57_1831 | ACICU_01633 | HMPREF0010_00772 | | ABIBUN_08805 |
| <i>Periplasmic protein TonB, links inner and outer membranes</i> | No esta | No esta | No esta | No esta | ABIBUN_09860 |
| <i>ExbB-like</i> | No esta | No esta | No esta | No esta | ABIBUN_09865 |
| <i>ExbD-like putative biopolymer transport protein</i> | No esta | No esta | No esta | No esta | ABIBUN_09870 |
| <i>Outer membrane receptor proteins, mostly Fe transport</i> | No esta | No esta | No esta | No esta | ABIBUN_09880 |
| <i>Outer membrane receptor proteins, mostly Fe</i> | No esta | No esta | No esta | No esta | ABIBUN_09885 |
| <i>TonB family protein Periplasmic protein TonB, links inner and outer membranes</i> | AB57_0535 | ACICU_00462 | HMPREF0010_01786 | A1S_0452 | AB57_0535 |
| <i>ExbB oriteub Biopolymer transport proteins</i> | AB57_0536 | ACICU_00463 | HMPREF0010_01785 | A1S_0453 | ABIBUN_02367 |
| <i>ExbD protein Biopolymer transport protein</i> | AB57_0537 | ACICU_00464 | HMPREF0010_01784 | A1S_0454 | ABIBUN_02372 |
| <i>TonB- Outer membrane receptor proteins, mostly Fe transport</i> | AB57_2257 | ACICU_02032 | HMPREF0010_00409 | A1S_1921 | ABIBUN_10820 |
| <i>TonB Outer membrane receptor proteins, mostly Fe transport</i> | AB57_1148 | ACICU_01101 | HMPREF0010_02968 | A1S_1063 | ABIBUN_05927 |

ID del grupo de genes codificantes encargados de la biosíntesis y polimerización de la cápsula

| GEN | AB0057 | ACICU | ATCC19606 | 17978 | 107m |
|--------------------|-----------|-------------|------------------|----------|--------------|
| <i>MviN</i> | AB57_0088 | ACICU_00068 | HMPREF0010_03293 | A1S_0046 | ABIBUN_00410 |
| <i>fkpA---fkIB</i> | AB57_0089 | ACICU_00069 | HMPREF0010_03292 | A1S_0047 | ABIBUN_00415 |
| <i>fkpA</i> | AB57_0090 | ACICU_00070 | HMPREF0010_03291 | A1S_0048 | ABIBUN_00420 |
| <i>Ptk</i> | AB57_0091 | ACICU_00071 | HMPREF0010_03290 | A1S_0049 | ABIBUN_00425 |
| <i>Ptp</i> | AB57_0092 | ACICU_00072 | HMPREF0010_03289 | A1S_0050 | ABIBUN_00430 |
| <i>epsA</i> | AB57_0093 | ACICU_00073 | HMPREF0010_03288 | A1S_0051 | ABIBUN_00435 |

ID de genes codificantes de fosfolipasas en cepas de *A. baumannii*

| Gen | AB0057 | ACICU | ATCC 19606 | ATCC 17978 | 107M |
|---------------------------------------|-----------|-------------|------------------|------------|--------------|
| Phospholipase C (plc) | AB57_0084 | ACICU_00064 | HMPREF0010_03297 | A1S_0043 | ABIBUN_00390 |
| Phospholipase C (plc) | AB57_2376 | ACICU_02247 | HMPREF0010_00294 | A1S_2055 | ABIBUN_11815 |
| Outer membrane phospholipase A (pldA) | AB57_2255 | ACICU_02030 | HMPREF0010_00411 | A1S_1919 | ABIBUN_10810 |
| phospholipase D (pld) | AB57_3442 | ACICU_03190 | HMPREF0010_03706 | A1S_2989 | ABIBUN_16124 |
| phospholipase D (pld) | AB57_1997 | ACICU_01803 | HMPREF0010_00607 | A1S_2891 | ABIBUN_09685 |

ID de genes codificantes de proteínas de membrana externa asociadas a virulencia en cepas de *A. baumannii*

| GEN | AB0057 | ACICU | ATCC 19606 | ATCC 17978 | 107m |
|-----------------------------------|-----------------|-------------------|------------------------|----------------|--------------|
| Uncharacterized conserved protein | AB57_3343 | ACICU_03088 | HMPREF0010_02783 | A1S_2839 | ABIBUN_15638 |
| Outer membrane protein (Omp38) | AB57_3344 | ACICU_03089 | HMPREF0010_02782 | A1S_2840 | ABIBUN_15643 |
| Tfp pilus assembly protein FimT | AB57_3345 | ACICU_03090 | HMPREF0010_02781 | A1S_2841 | ABIBUN_15648 |
| (ompW) | AB57_2400 (370) | ACICU_02271 | HMPREF0010_02352 (356) | A1S_2075 (370) | ABIBUN_11940 |
| (ompW) | AB57_2758 | ACICU_02527 (356) | HMPREF0010_00270 (370) | A1S_2325 | ABIBUN_13282 |
| (ompW) | AB57_0376 | ACICU_00310 | F911_03613 (196) | A1S_0292 | ABIBUN_01587 |

