



HAL
open science

Acinetobacter spp. et réservoir de gènes de carbapénèmases

Samy Figueiredo

► **To cite this version:**

Samy Figueiredo. Acinetobacter spp. et réservoir de gènes de carbapénèmases. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA114823 . tel-00743039

HAL Id: tel-00743039

<https://theses.hal.science/tel-00743039>

Submitted on 18 Oct 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

ÉCOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

PÔLE : MICROBIOLOGIE / THERAPEUTIQUES ANTIINFECTIEUSES

DISCIPLINE : BACTÉRIOLOGIE

ANNÉE 2010 - 2011

SÉRIE DOCTORAT N° 1119

THÈSE DE DOCTORAT

soutenu le 17/10/2011

par

Samy FIGUEIREDO

Acinetobacter spp. et
réservoir de gènes de carbapénèmases

Directeur de thèse :	Mr le Professeur Patrice NORDMANN	Chef de service, Microbiologie, CHU Bicêtre.
Co-directeur de thèse :	Mr le Docteur Laurent POIREL	Chargé de recherche INSERM, CHU Bicêtre.
<u>Composition du jury :</u>		
Président du jury :	Mr le Professeur Thierry LAMBERT	Professeur des Universités, Université Paris-Sud 11.
Rapporteurs :	Mme le Professeur Marie-Laure JOLY-GUILLOU	Chef de service, Microbiologie, CHU Angers.
	Mme le Professeur Emmanuelle DE	Professeur des Universités, Université de Rouen.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier très sincèrement :

Monsieur le Professeur Patrice NORDMANN, pour m'avoir donné la chance de réaliser ma thèse dans son unité de recherche et pour m'avoir enseigné la rigueur scientifique.

Monsieur le Docteur Laurent POIREL, qui m'a encadré tout au long de ce travail, pour son enseignement, ses encouragements et sa compréhension à l'égard de ma « double-vie » en clinique.

Monsieur le Professeur Thierry LAMBERT, qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury.

Madame le Professeur Marie-Laure JOLY-GUILLOU et Madame le Professeur Emmanuelle DÉ, qui m'ont fait l'honneur d'analyser ce travail et d'en être les rapporteurs.

Messieurs les Docteurs Thierry NAAS et Nicolas FORTINEAU pour leurs précieux conseils et leur sympathie.

Toutes les personnes qui constituent (ou ont constitué) la dynamique équipe de l'unité INSERM U914 et du laboratoire de Bactériologie du CHU Bicêtre : Sandrine BERNABEU, Docteur Pauline MUGNIER, Docteur Anaïs POTRON, Rémy BONNIN, Docteur Gaëlle CUZON, Docteur Delphine GIRLICH, Florence BUSSY, Docteur Vincent CATTOIR, Docteur Amélie CARRÈR, Docteur Béatrice BERÇOT, Fatemeh NAMDARI, Docteur Stéphane CORVEC, Winchygn LIU, Renata PICAIO, Roméo SIMOES, José-Manuel RODRIGUEZ-MARTINEZ, pour la somme de connaissances qu'ils m'ont apportée et pour leur bonne humeur.

Messieurs les Professeurs Dan BENHAMOU et Jacques DURANTEAU, pour m'avoir accueilli comme médecin au sein du Département Anesthésie-Réanimation du CHU Bicêtre et m'avoir encouragé dans mes projets de recherche.

Tous mes collègues du Département Anesthésie-Réanimation du CHU Bicêtre, en particulier les Docteurs Anatole HARROIS, Pierre-Étienne LEBLANC, Malcie MESNIL et Bernard VIGUÉ pour leur soutien.

Mon épouse Aurélie, mes enfants Raphaël et Manon, mon frère Nelson et mes parents, ma belle-famille, mes amis, pour l'énergie et le bonheur que je puise dans leur présence.

À Raphaël et Manon,

À Aurélie.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

aa	Acide aminé
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AmpC	Céphalosporinase
ARN	Acide Ribonucléique
ATB	Antibiotique
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
BGN	Bacille à Gram négatif
BLSE	β -Lactamase à Spectre Etendu CA-SFM
CA-SFM	Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
CHDL	β -Lactamase du groupe D (oxacillinase) hydrolysant les carbapénèmes
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
DO	Densité Optique
DBL	β -Lactamase du groupe D
E-U	Etats-Unis
GC %	Contenu en G+C
IRL	<i>Inverted Repeat Left</i> (séquence inversée répétée gauche)
IRR	<i>Inverted Repeat Right</i> (séquence inversée répétée droite)
IS	<i>Insertion Sequence</i> (séquence d'insertion)
kb	kilobase (=1000 pb)
kDa	kiloDalton
MBL	Métallo- β -Lactamase
NaCl	chlorure de sodium
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (cadre ouvert de lecture)
pb	paire de bases

PLP	Protéine de liaison aux pénicillines
PCR	Polymerase Chain Reaction (réaction de polymérisation en chaîne)
TC	Transconjugant
TF	Transformant
UFC	Unité Formant Colonie
UV	Ultra-violet

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Représentation des quatre principales classes de β -lactamines obtenues par substitution ou fixation d'hétérocycles à partir du noyau β -lactame.....	3
Figure 2. Structure des carbapénèmes.....	6
Figure 3. Structure de la paroi des bactéries.....	8
Figure 4. Mécanisme d'action simplifié des β -lactamases à sérine active.....	15
Figure 5. Contribution du gène <i>bla</i> _{OXA-23} dans le phénotype de résistance de <i>A. baumannii</i> ..	25
Figure 6. Cartographie de la dissémination mondiale du gène <i>bla</i> _{OXA-23} , juillet 2011.....	26
Figure 7. Les différents types de métallob- β -lactamases (MBLs).....	29
Figure 8. Les différents déterminants de type VIM.....	30
Figure 9. Organisation d'une séquence d'insertion : exemple de IS <i>Abal</i>	51
Figure 10. Transposons associés au gène <i>bla</i> _{OXA-23} chez <i>A. baumannii</i>	54
Figure 11. Organisation d'un transposon de classe II : exemple du transposon Tn21.....	55
Figure 12. Structure générale d'un intégron de classe 1 et mouvement des gènes cassettes...56	
Figure 13. Tn2006 : un transposon associé au gène <i>bla</i> _{OXA-23} chez <i>A. baumannii</i>	58
Figure 14. Amplification du gène <i>bla</i> _{OXA-23} de trois souches de <i>A. radioresistens</i> par Polymerase Chain Reaction (PCR).....	59
Figure 15. Antibiogramme de <i>A. radioresistens</i> C possédant le gène <i>bla</i> _{OXA-103}	63
Figure 16. Antibiogramme de <i>E. coli</i> TOP10 (pTOPO-OXA-103) exprimant OXA-103.....	63
Figure 17. Identification du support des gènes de type <i>bla</i> _{OXA-23} dans les souches de <i>A. radioresistens</i>	65
Figure 18. Dendrogramme obtenu pour 32 β -lactamases de classe D dont OXA-134.....	69
Figure 19. Alignement des 7 séquences protéiques correspondant aux β -lactamases OXA-134-like.....	70
Figure 20. Antibiogramme de <i>A. lwoffii</i> /Acinetobacter genomic species 9 CIP 64.7 possédant le gène <i>bla</i> _{OXA-134}	73
Figure 21. Antibiogramme de <i>E. coli</i> TOP10 (pTOPO-OXA-134) exprimant OXA-134.....	73
Figure 22. Identification du support du gène <i>bla</i> _{OXA-134} dans deux souches de <i>A. lwoffii</i>	75

Figure 23. Alignement des acides aminés des β-lactamases de classe D OXA-211, OXA-213 et OXA-214 avec les séquences de OXA-23, OXA-40, OXA-58 et OXA-51.....	80
Figure 24. Dendrogramme obtenu pour 22 β-lactamases de classe D, dont OXA-211, OXA-213 et OXA-214.....	81
Figure 25. Schéma représentant les deux isolats de <i>A. baumannii</i> identifiés chez un patient pendant son hospitalisation en réanimation.....	87
Figure 26. Génotypage des deux souches de <i>A. baumannii</i> A1 et A2 par électrophorèse en champ pulsé après restriction par l'enzyme <i>Apal</i>	88
Figure 27. Environnement génétique du gène <i>bla</i> _{OXA-51} dans 3 souches différentes de <i>A. baumannii</i> isolées en Grèce.....	94
Figure 28. Séquences nucléotidiques des régions promotrices putatives -35 et -10 au sein de <i>ISAbal</i> décrite dans les souches Ab2 et Ab5.....	96
Figure 29. Antibiogramme de la souche de <i>Acinetobacter</i> spp. A154.....	98
Figure 30. CMI d'imipénème avec et sans EDTA pour la détection de métallo-β-lactamase dans la souche de <i>Acinetobacter</i> spp. A154.....	98
Figure 31. Environnement génétique du gène <i>bla</i> _{VIM-4} dans la souche de <i>Acinetobacter</i> genomic species 16 A154.....	99
Figure 32. Identification du support du gène <i>bla</i> _{VIM-4} dans la souche A154 de <i>Acinetobacter</i> genomic species 16.....	100
Figure 33. Bandelette E-test utilisée pour déterminer la CMI du méropénème d'une souche de <i>A. baumannii</i>	110
Figure 34. Schéma représentant le principe et les grandes étapes de la TAIL-PCR (Thermal Assymetric Inter-Laced PCR).....	117
Figure 35. Principe du système de détection ECL.....	119

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Résumé des caractéristiques des principales oxacillinases citées	17
Tableau 2. Description des espèces appartenant au genre <i>Acinetobacter</i>	35
Tableau 3. Principales β -lactamases décrites chez <i>Acinetobacter</i> spp. non- <i>baumannii</i>	46
Tableau 4. Enzymes d'inactivation des aminosides les plus communes chez <i>A. baumannii</i> et substrats préférentiels.....	47
Tableau 5. Analyse des séquences nucléotidiques obtenues après séquençage des produits de PCR purifiés du gène <i>bla</i> _{OXA-23} identifiés dans quatre souches de <i>A. radioresistens</i>	61
Tableau 6. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) d'imipénème (IMP), ertapénème (ETP) et méropénème (MP) des quatre variants de la β -lactamase OXA-23 dont les gènes ont été clonés par le plasmide TOPO et surexprimés chez <i>E. coli</i> TOP10.....	64
Tableau 7. CMIs des β -lactamines pour les isolats <i>A. lwoffii</i> , <i>E. coli</i> TOP10 pOXA-134 et la souche de référence <i>E. coli</i> TOP10.....	74
Tableau 8. Paramètres cinétiques de la β -lactamase OXA-134 purifiée.....	74
Tableau 9. Caractéristiques des β -lactamases OXA-211, OXA213 et OXA-214.....	78
Tableau 10. CMIs des β -lactamines pour les souches représentatives de différentes espèces de <i>Acinetobacter</i> et des souches recombinantes.....	84
Tableau 11. Activités enzymatiques spécifiques comparées de OXA-211, OXA-213 et OXA-214 exprimées chez <i>E. coli</i> TOP10.....	85
Tableau 12. Analyse moléculaire du contenu en gènes de β -lactamases et en séquences d'insertion au sein des deux souches de <i>A. baumannii</i> A1 et A2.....	89
Tableau 13. CMIs de certains antibiotiques pour les souches de <i>A. baumannii</i> A1, A2 et le mutant A2 dont le gène <i>bla</i> _{OXA-66} a été inactivé A2 (Δ OXA-66).....	90
Tableau 14. Caractérisation des souches de <i>A. baumannii</i> isolés à Thessaloniki, Grèce.....	92
Tableau 15. Caractéristiques des souches de référence utilisées.....	110
Tableau 16. Vecteurs de clonage et plasmides utilisés.....	111
Tableau 17. Oligonucléotides utilisés dans ce travail.....	114
Tableau 18. Composition des solutions utilisées pour l'hybridation ADN-ADN.....	118
Tableau 19. Composition des solutions utilisées pour l'électrophorèse en champ pulsé.....	120

TABLE DES MATIÈRES

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	1
Introduction	1
Chapitre A : Les β-lactamines.....	2
1. Structure des β -lactamines	2
1.1. Les pénicillines	3
1.2. Les céphalosporines	4
1.3. Les carbapénèmes	5
1.4. Les monobactames	6
1.5. Les inhibiteurs de β -lactamases (acide clavulanique, tazobactam, sulbactam)	7
2. Paroi bactérienne et mode d'action des β -lactamines	7
2.1. Paroi bactérienne	7
2.2. Mode d'action des β -lactamines	8
3. Mécanismes de résistance bactérienne aux β -lactamines	9
3.1. Défaut de pénétration de l'antibiotique : diminution de la perméabilité	9
3.2. Modification de la cible	10
3.3. Excrétion de l'antibiotique : efflux	10
3.4. Inactivation enzymatique de l'antibiotique: production de β -lactamases	11
Chapitre B : Les β-lactamases	12
1. Généralités	12
1.1. Classifications	12
1.1.1. Classification de Ambler	12
1.1.2. Classification de Bush	13
1.2. Mécanisme d'action des β -lactamases	14
2. Les oxacillinases	15
2.1. Oxacillinases naturelles	18
2.2. Oxacillinases acquises à spectre restreint	19
2.3. Oxacillinases acquises à spectre étendu	21

2.4. Oxacillinases à activité de carbapénèmase : CHDLs	21
2.5. Oxacillinase OXA-23	24
3. Les métallo- β -lactamases (MBLs)	28
3.1. Généralités	28
3.2. Les MBLs de type VIM	29
Chapitre C : <i>Acinetobacter</i> spp.	31
1. Taxonomie	31
2. Diagnostic d'espèce	32
3. Morphologie, métabolisme et habitat	33
4. Pouvoir pathogène et virulence	36
5. Impact clinique de <i>Acinetobacter</i> spp.	37
5.1. Impact clinique de <i>A. baumannii</i>	37
5.2. Impact clinique de <i>Acinetobacter</i> non- <i>baumannii</i>	39
6. Sensibilité aux β -lactamines et mécanismes de résistance chez <i>A. baumannii</i>	40
6.1. Phénotype sauvage de <i>A. baumannii</i>	40
6.2. Supports génétiques de la résistance aux β -lactamines chez <i>A. baumannii</i>	41
6.3. Résistances acquises aux β -lactamines chez <i>A. baumannii</i>	42
6.4. Résistances acquises aux carbapénèmes chez <i>A. baumannii</i>	43
6.4.1. Mécanismes enzymatiques	43
6.4.2. Mécanismes non enzymatiques	43
7. Sensibilité aux β -lactamines et mécanismes de résistance chez <i>Acinetobacter</i> spp. non- <i>baumannii</i>	45
8. Résistance aux aminosides chez <i>Acinetobacter</i> spp.	46
9. Résistance aux quinolones chez <i>Acinetobacter</i> spp.	47
10. Résistance aux autres antibiotiques chez <i>Acinetobacter</i> spp.	48
Chapitre D : Les éléments génétiques mobiles.....	50
1. Les séquences d'insertion	50
1.1. Organisation	50
1.1.1. Les séquences inversées répétées (IR)	50
1.1.2. La transposase	50
1.1.3. Les séquences en répétition directe (DR)	51

1.2.	Régulation de l'activité de transposition	51
1.3.	Les séquences d'insertion associées au gène <i>bla</i> _{OXA-23}	52
1.3.1.	<i>ISAbal</i>	52
1.3.2.	<i>ISAbal4</i>	53
2.	Les transposons	54
2.1.	Les transposons de classe I	54
2.2.	Les transposons de classe II	55
2.3.	Les transposons conjugatifs	55
3.	Les intégrons de classe 1	56
OBJECTIFS SCIENTIFIQUES		57
RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX		58
A : Identification du progéniteur du gène <i>bla</i>_{OXA-23} conférant une résistance aux carbapénèmes chez <i>A. baumannii</i> (Article 1).....		58
1.	Recherche du gène <i>bla</i> _{OXA-23} au sein de souches de <i>Acinetobacter</i> spp.	58
2.	Recherche des structures génétiques identifiées en aval du gène <i>bla</i> _{OXA-23} au sein de Tn2006 et de Tn2007 chez <i>A. radioresistens</i>	60
3.	Séquençage et analyse nucléotidique des produits de PCR purifiés du gène <i>bla</i> _{OXA-23} identifiés dans quatre souches de <i>A. radioresistens</i>	60
4.	Étude de l'expression des gènes de type <i>bla</i> _{OXA-23} chez <i>A. radioresistens</i>	62
5.	Expression comparée des quatre variants du gène <i>bla</i> _{OXA-23} identifiés chez <i>A. radioresistens</i>	62
6.	Caractéristiques enzymatiques et activités enzymatiques spécifiques comparées des quatre variants de la β-lactamase OXA-23 surexprimés chez <i>E. coli</i>	64
7.	Étude du support génétique des gènes de type <i>bla</i> _{OXA-23} identifiés chez <i>A. radioresistens</i>	64
8.	Recherche du réservoir de <i>A. radioresistens</i> et du lieu éventuel d'échange du gène <i>bla</i> _{OXA-23} entre <i>A. baumannii</i> et <i>A. radioresistens</i>	66
B : Caractérisation de OXA-134, oxacillinase à activité de carbapénémase de <i>A. lwoffii</i> (Article 2).....		67
1.	Recherche de gènes de type <i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-40} , <i>bla</i> _{OXA-58} , et <i>bla</i> _{OXA-143} , au sein de souches de <i>Acinetobacter</i> spp.	67

2. Étude de l'expression des gènes de type <i>bla</i> _{OXA-134} chez <i>A. lwoffii</i>	71
3. Expression comparée des variants du gène <i>bla</i> _{OXA-134} identifiés chez <i>A. lwoffii</i>	71
4. Support génétique des gènes de type <i>bla</i> _{OXA-134} identifiés chez <i>A. lwoffii</i>	75
5. Recherche de la diffusion éventuelle des gènes de type <i>bla</i> _{OXA-134} chez <i>A. baumannii</i>	76

C : Caractérisation des oxacillinases naturelles de *A. johnsonii*,

***A. calcoaceticus* et *A. haemolyticus*: OXA-211, OXA-213 et OXA-214**

(Article 3)..... 77

1. Détection et caractérisation de nouveaux gènes codant pour des CHDLs au sein de souches de <i>Acinetobacter</i> spp.	77
2. Distribution des gènes de type <i>bla</i> _{OXA-211} chez <i>A. johnsonii</i> , <i>bla</i> _{OXA-213} chez <i>A. calcoaceticus</i> et <i>bla</i> _{OXA-214} chez <i>A. haemolyticus</i>	82
3. Étude de l'expression des gènes de type <i>bla</i> _{OXA-211} chez <i>A. johnsonii</i> , <i>bla</i> _{OXA-213} chez <i>A. calcoaceticus</i> et <i>bla</i> _{OXA-214} chez <i>A. haemolyticus</i>	83
4. Expression comparée des gènes <i>bla</i> _{OXA-211} , <i>bla</i> _{OXA-213} et <i>bla</i> _{OXA-214} et activités enzymatiques comparées de OXA-211, OXA-213 et OXA-214	85
5. Support génétique des gènes <i>bla</i> _{OXA-211} , <i>bla</i> _{OXA-213} et <i>bla</i> _{OXA-214}	85

D : Sélection *in vivo* d'une souche de *A. baumannii* de sensibilité diminuée aux carbapénèmes médiée par la surexpression du gène codant pour l'oxacillinase naturelle de *A. baumannii* OXA-66 (Article 4) 86

1. Patient et souches	86
2. Profils de résistance aux antibiotiques des souches de <i>A. baumannii</i> A1 et A2	86
3. Investigations moléculaires	87
4. Rôle de la structure IS <i>Aba1</i> - <i>bla</i> _{OXA-66}	89
a. Étude transcriptionnelle quantitative par RT-PCR	89
b. Inactivation du gène <i>bla</i> _{OXA-66} dans la souche de <i>A. baumannii</i> A2	89

E : Caractérisation de IS*Aba9*, une nouvelle séquence d'insertion pour la surexpression du gène naturel *bla*_{OXA-51} de *A. baumannii* (Article 5) ... 91

1. Caractérisation des souches de <i>Acinetobacter</i> spp. provenant de Grèce	91
--	----

2. Analyse moléculaire	94
3. Caractérisation et distribution de IS <i>Aba9</i>	95
4. Étude du rôle de IS <i>Aba9</i> dans l'expression du gène <i>bla</i> _{OXA-51}	95

F : Identification de la métallo-β-lactamase VIM-4 chez *Acinetobacter* spp.

(Article 6).....97

1. Caractérisation de la souche bactérienne de <i>Acinetobacter</i> spp. A154	97
2. Analyse moléculaire de la souche bactérienne <i>Acinetobacter</i> spp. A154	99
a. Identification d'espèce	99
b. Analyse des déterminants de résistance aux antibiotiques	99
c. Étude du support génétique du gène <i>bla</i> _{VIM-4}	100

DISCUSSION ET PERSPECTIVES 101

MATÉRIELS ET MÉTHODES 109

A. Techniques bactériologiques	109
1. Souches bactériennes, milieux de culture	109
2. Antibiogrammes et Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI)	109
B. Techniques de biologie moléculaire	111
1. Vecteur de clonage et plasmides utilisés	111
2. Purification des acides nucléiques	111
2.1. Extraction d'ADN génomique	111
2.2. Extraction d'ADN plasmidique	112
2.3. Extraction des acides ribonucléiques	113
2.4. Purification des produits de PCR	113
3. Digestion par les enzymes de restriction	113
4. Ligation et transformation par électroporation	114
5. Electrophorèse en gel d'agarose	114
6. Réaction de polymérisation	114
6.1. Réactions d'amplification par PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	114
6.2. Réactions de séquençage	116
6.3. Réaction de TAIL-PCR (<i>Thermal Assymetric InterLaced-PCR</i>)	116
C. Techniques génétiques	118
1. Hybridation ADN-ADN	118

1.1. Southern-blot	118
1.2. Hybridation non radioactive (chimioluminescence)	118
2. Électrophorèse en champ pulsé (PFGE)	119
D. Techniques biochimiques	121
1. Extraction de β -lactamases	121
2. Purification de β -lactamases	121
3. Dosage de protéines	121
4. Détermination des constantes enzymatiques	122
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	123
ANNEXES.....	139
A : Article 1.....	140
B : Article 2.....	141
C : Article 3.....	142
D : Article 4.....	143
E : Article 5.....	144
F : Article 6.....	145

Étude bibliographique

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION

Au cours des dernières décennies, la résistance des bactéries vis-à-vis des agents anti-infectieux a été croissante, notamment en raison de l'utilisation large et parfois inadéquate des antibiotiques.

L'espèce bactérienne *Acinetobacter baumannii* illustre parfaitement cette capacité d'adaptation des microorganismes face à un environnement hostile : autrefois sensible à la quasi-totalité des β -lactamines, elle est aujourd'hui responsable d'infections nosocomiales survenant par épidémies et impliquant des souches de plus en plus fréquemment multirésistantes. La résistance aux carbapénèmes, molécules considérées comme traitement de choix des infections à *A. baumannii*, est à ce titre particulièrement problématique puisqu'elle diminue de façon drastique les possibilités thérapeutiques.

Nos objectifs étaient d'étudier les déterminants de la résistance aux antibiotiques, particulièrement aux carbapénèmes au sein du genre *Acinetobacter*.

CHAPITRE A: LES β -LACTAMINES

Les β -lactamines représentent la plus importante famille d'antibiotiques par le nombre de molécules disponibles et par le volume d'utilisation, aussi bien en ville qu'à l'hôpital. Cette utilisation importante est due à leur large spectre d'action, leur efficacité, leur faible toxicité et à leur faible coût pour de nombreuses molécules.

L'histoire des β -lactamines débute dans les années 1930 par les observations de Sir Alexander Fleming concernant un agent antibactérien dénommé pénicilline isolé à partir du champignon *Penicillium notatum* (Fleming, 1929). Il faudra attendre le début des années 1960 pour voir apparaître les premières synthèses de β -lactamines permettant leur développement à l'échelle industrielle (Rolinson et coll. 1998). Cependant, l'utilisation large des β -lactamines depuis plus de 60 ans s'est accompagnée d'une augmentation importante de la résistance bactérienne à ces antibiotiques. Et le développement de nouveaux antibiotiques, notamment contre les bactéries à Gram négatif, connaît un franc ralentissement depuis plus de 10 ans.

1. STRUCTURE DES β -LACTAMINES

La base commune à toutes les β -lactamines est le noyau β -lactame (Figure 1). À partir de ce cycle, quatre sous-familles ont été développées par adjonction de chaînes latérales : les pénicillines (ou pénames), les céphalosporines (ou céphèmes), les monobactames et les carbapénèmes (Bryskier, 1984) (Figure 1). Toutes ces molécules présentent des caractéristiques communes ainsi que des particularités propres à chaque classe, notamment en termes de spectre antibactérien.

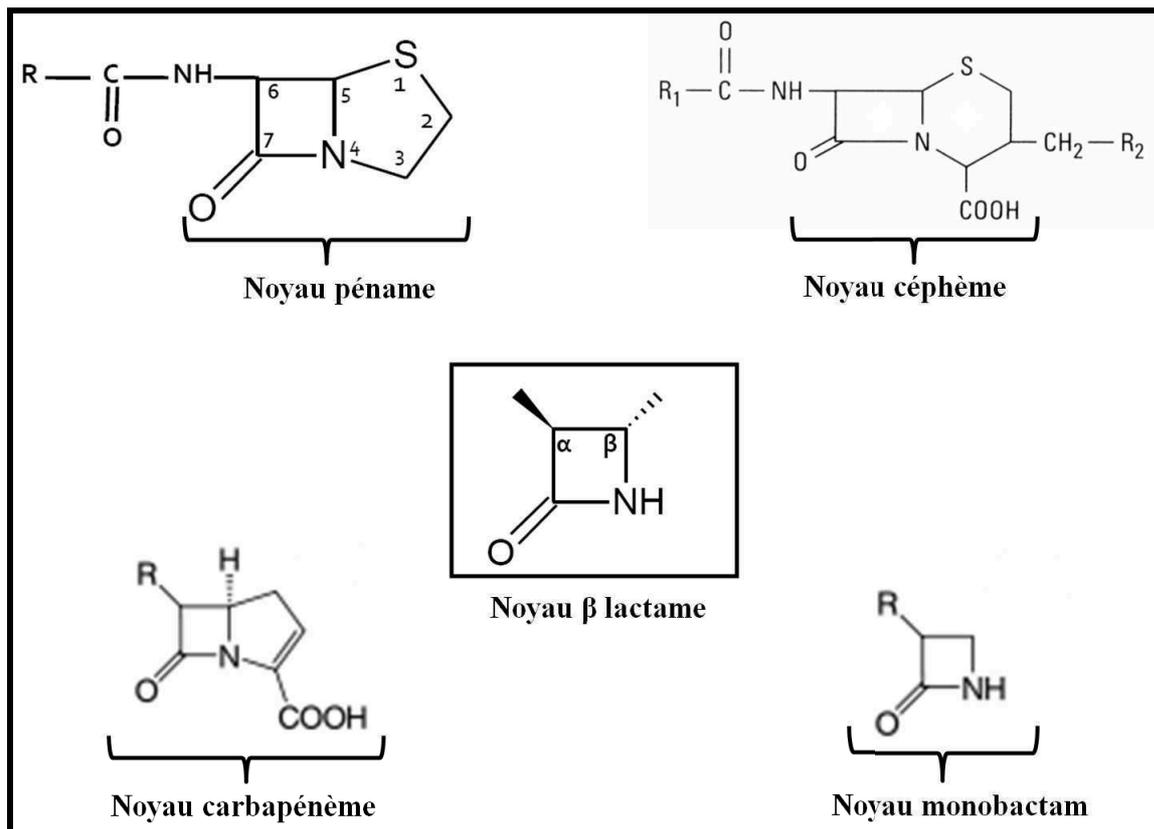


Figure 1. Représentation des quatre principales classes de β-lactamines obtenues par substitution ou fixation d'hétérocycles à partir du noyau β-lactame (au centre).

1.1. Les pénicillines

La formule générale des pénicillines associe un noyau β-lactame à un cycle thiazolidine et une chaîne latérale en C-6 (Figure 1). Le groupe des pénicillines est constitué d'un nombre important de molécules dont les principales sont :

- Benzylpénicillines : pénicilline G
- Aminopénicillines : ampicilline, amoxicilline
- Uréidopénicillines : pipéracilline
- Carboxypénicillines : carbénicilline, ticarcilline

Spectre d'action des pénicillines :

- Benzylpénicillines : bactéries à Gram (+), anaérobies, certaines bactéries à Gram (-)
- Aminopénicillines : bactéries à Gram (+), anaérobies, cocci à Gram (-) et certaines espèces d'entérobactéries (essentiellement *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella* et *Shigella* spp.)

- Carboxypénicillines et uréidopénicillines : spectre réduit vers les Gram (+), spectre élargi vers les Gram (-), incluant notamment *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*.

1.2. Les céphalosporines

Les céphalosporines se distinguent chimiquement des pénicillines par le remplacement du cycle thiazolidine par un cycle dihydrothiazine (Figure 1). On distingue quatre générations de céphalosporines. Elles sont classées en fonction de leur date d'apparition, qui correspond à chaque fois à l'acquisition de nouvelles propriétés. En voici quelques exemples :

- Première génération : céfalotine, cefazoline
- Deuxième génération : céfamandole, céfuroxime, céfoxitine
- Troisième génération : céfotaxime, ceftazidime, ceftriaxone
- Quatrième génération : céfépime, cefpirome

Les céphalosporines de première génération ont un spectre d'action qui se limite aux cocci à Gram positif et à quelques bacilles à Gram négatif ne produisant pas de céphalosporinase. Ces molécules sont, d'autre part, aisément dégradées par les β -lactamases (Bryskier. 1984).

L'amélioration la plus importante fut apportée par l'apparition des céphalosporines de troisième génération. L'addition de différents groupements chimiques a permis d'augmenter de façon considérable la stabilité de ces molécules et leur activité antibactérienne vis-à-vis des bacilles à Gram négatif. Ces molécules restent cependant hydrolysées par les céphalosporinases hyperproduites ainsi que par les β -lactamases à spectre étendu (BLSE).

Les céphalosporines dites de quatrième génération possèdent la propriété de résister à l'hydrolyse des céphalosporinases hyperproduites grâce à une double caractéristique. Elles possèdent une très faible affinité pour ces céphalosporinases ainsi qu'une bonne affinité pour les protéines liant les pénicillines (PLP). Ainsi, elles agissent avant que les enzymes bactériennes n'aient eu le temps de les dégrader. Ces molécules sont particulièrement efficaces vis-à-vis des bacilles à Gram négatif (Bryskier. 1984). Même si les céphalosporines de quatrième génération sont plus stables à l'hydrolyse par les β -lactamases à spectre étendu, elles demeurent néanmoins hydrolysées par les plus efficaces d'entre elles.

1.3. Les carbapénèmes

Les carbapénèmes sont des β -lactamines possédant un très large spectre anti-bactérien associé à une grande stabilité envers la quasi-totalité des β -lactamases. Elles sont historiquement considérées comme le traitement de choix des infections sévères à bactéries à Gram négatif (Kattan et coll. 2008). Quatre molécules sont commercialisées : l'imipénème, le méropénème, l'ertapénème et le doripénème (Figure 4).

C'est en 1976 que fut découverte la thiénamycine, produite par *Streptomyces cattleya*. La molécule était instable, ce qui conduisit au développement, dans les années 1980, d'un dérivé N-forminidoyle semi-synthétique, l'imipénème. En raison d'une dégradation rapide *in vivo* par la dehydropeptidase rénale humaine (DHP-1), l'imipénème doit être co-administré avec un inhibiteur de cette enzyme, la cilastatine. L'imipénème possède un quasi-monopole au sein de cette famille en France, alors que le méropénème, apparu environ dix ans plus tard, est largement utilisé dans d'autres pays d'Europe et en Amérique du Nord. Le début des années 2000 a vu l'apparition de nouvelles carbapénèmes : l'ertapénème et le doripénème.

Certains auteurs ont proposé une classification des différentes carbapénèmes : le Groupe 1 comprend des molécules à large spectre avec une efficacité limitée sur les bacilles à Gram négatif non fermentant (ertapénème essentiellement). Le Groupe 2 comprend les molécules ayant une bonne efficacité sur les bacilles à Gram négatif non fermentant (imipénème, méropénème, doripénème). Un troisième groupe comprend notamment le composé PZ-601, une carbapénème en cours de développement avec une activité anti-Gram positif, notamment le staphylocoque résistant à la méthicilline (Kattan et coll. 2008).

Les carbapénèmes sont actives sur les bactéries à Gram positif, sauf les staphylocoques résistants à la méticilline et *Enterococcus faecium* résistant à l'ampicilline. Les entérobactéries sont très sensibles aux carbapénèmes, y compris les souches productrices de BLSE et les souches productrices de céphalosporinase à haut niveau. L'imipénème, le doripénème et le méropénème ont une activité comparable sur *P. aeruginosa* et *A. baumannii* (Kattan et coll. 2008). *Stenotrophomonas maltophilia* et certains isolats de *Clostridium difficile* sont résistants aux carbapénèmes.

Initialement, seuls les bacilles à Gram négatif producteurs de métallo- β -lactamases, de carbapénémases de la classe A de Ambler ou présentant une imperméabilité à l'imipénème pouvaient être résistants aux carbapénèmes. Actuellement, l'émergence de β -lactamases de

classe D possédant un spectre étendu aux carbapénèmes remet en question l'efficacité de ces molécules en clinique. Les carbapénémases de classe D ont surtout été décrites chez *A. baumannii* (Poirel et Nordmann, 2006).

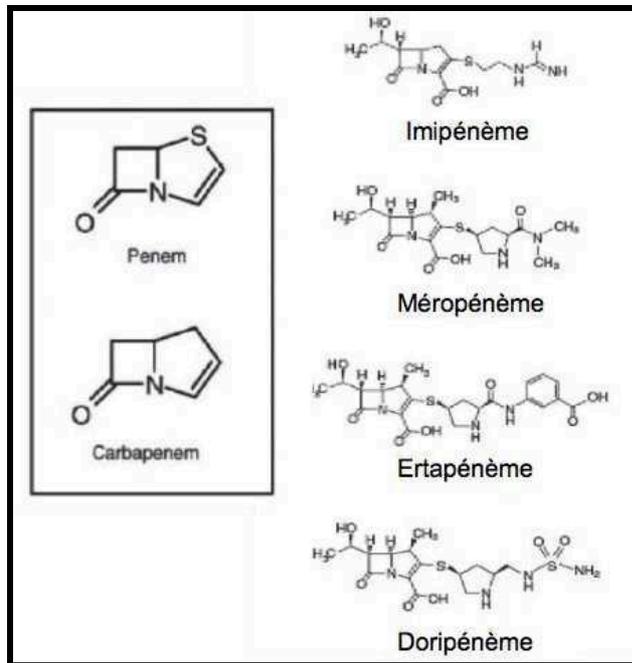


Figure 2. Structure des carbapénèmes.

1.4. Les monobactames

À la fin des années 1970, toutes les nouvelles β -lactamines identifiées étaient produites par les *Actinomycetes*. Sykes et son équipe entreprennent alors la recherche de nouveaux antibiotiques produits par d'autres organismes : ils découvriront les monobactames (Sykes et coll. 1981). Les monobactames sont des β -lactamines monocycliques inactives sur les bactéries à Gram positif et les anaérobies. Ces antibiotiques sont, en revanche, très actifs sur les entérobactéries et *P. aeruginosa*. L'activité anti Gram-négatif de l'aztréonam, chef de file de cette classe, est globalement comparable à celle des céphalosporines de 3^{ème} génération comme la ceftazidime. L'aztréonam présente une bonne stabilité vis-à-vis des β -lactamases de spectre restreint. De plus, les monobactames constituent les seules β -lactamines non hydrolysées par les métallo- β -lactamases.

1.5. Les inhibiteurs de β -lactamases (acide clavulanique, tazobactam, sulbactam)

Les inhibiteurs des β -lactamases ont été développés afin de neutraliser la production bactérienne de β -lactamases. Les premières recherches sur la découverte des inhibiteurs des β -lactamases débutèrent vers la fin des années 1960 et c'est en 1976 qu'est découvert l'acide clavulanique produit par une souche de *Streptomyces clavuligerous* (Brown et coll. 1976). En 1981, une combinaison de l'acide clavulanique avec de l'amoxicilline, suivie peu de temps après par une combinaison entre l'acide clavulanique et la ticarcilline sont commercialisées. La découverte de l'acide clavulanique et son introduction dans la pratique médicale ont été suivies par la découverte de plusieurs inhibiteurs de β -lactamases comme le sulbactam et le tazobactam (Rolinson. 1998).

Les inhibiteurs des β -lactamases possèdent une activité antibiotique généralement faible. Ce sont des substrats-suicide qui se lient de manière irréversible à la β -lactamase, empêchant l'action de celle-ci sur les β -lactamines. Ceci explique pourquoi les inhibiteurs des β -lactamases, en particulier l'acide clavulanique et le tazobactam, ne sont généralement pas utilisés seuls, mais en association avec un antibiotique comme l'amoxicilline, la ticarcilline ou la pipéracilline. Le sulbactam possède, en plus de son effet inhibiteur irréversible sur les β -lactamases, une activité antibiotique intrinsèque sur quelques espèces bactériennes comme *A. baumannii*.

Malgré leur intérêt en pratique médicale, les inhibiteurs des β -lactamases ne permettent pas d'inactiver l'ensemble des β -lactamases produites par les bactéries.

2. PAROI BACTÉRIENNE ET MODE D'ACTION DES β -LACTAMINES

2.1. Paroi bactérienne

Les β -lactamines agissent en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne par le biais d'une liaison à des cibles moléculaires spécifiques.

Le peptidoglycane est un constituant majeur de la paroi bactérienne puisqu'il est responsable de la forme de la bactérie et lui assure une protection physique et chimique. Il est présent chez les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, même si la constitution de la paroi de ces deux types de bactéries diffère (Figure 3). Le peptidoglycane est une macromolécule réticulée constituée par de longues chaînes glycaniques pontées par des chaînons peptidiques. Chaque

chaîne glycanique est constituée d'une alternance régulière de N-acétylglucosamine (NAG) et d'acide N-acétylmuramique (NAM). Chaque unité NAM est substituée par un tétrapeptide constitué de L-alanine, d'acide D-glutamique, de L-lysine (ou d'acide diaminopimélique selon l'espèce), et de D-alanine. Ces tétrapeptides sont reliés à ceux d'une autre chaîne glycanique par des liaisons dont la nature varie d'une espèce à l'autre. Cet ensemble forme un réseau tridimensionnel rigide entourant la membrane cytoplasmique de la bactérie et délimitant ainsi un espace périplasmique.

La biosynthèse du peptidoglycane s'effectue en trois étapes se déroulant successivement dans le cytoplasme, dans la membrane cytoplasmique puis dans l'espace périplasmique. Le peptidoglycane est une structure dynamique qui est continuellement synthétisée et hydrolysée au cours du cycle cellulaire (Figure 3).

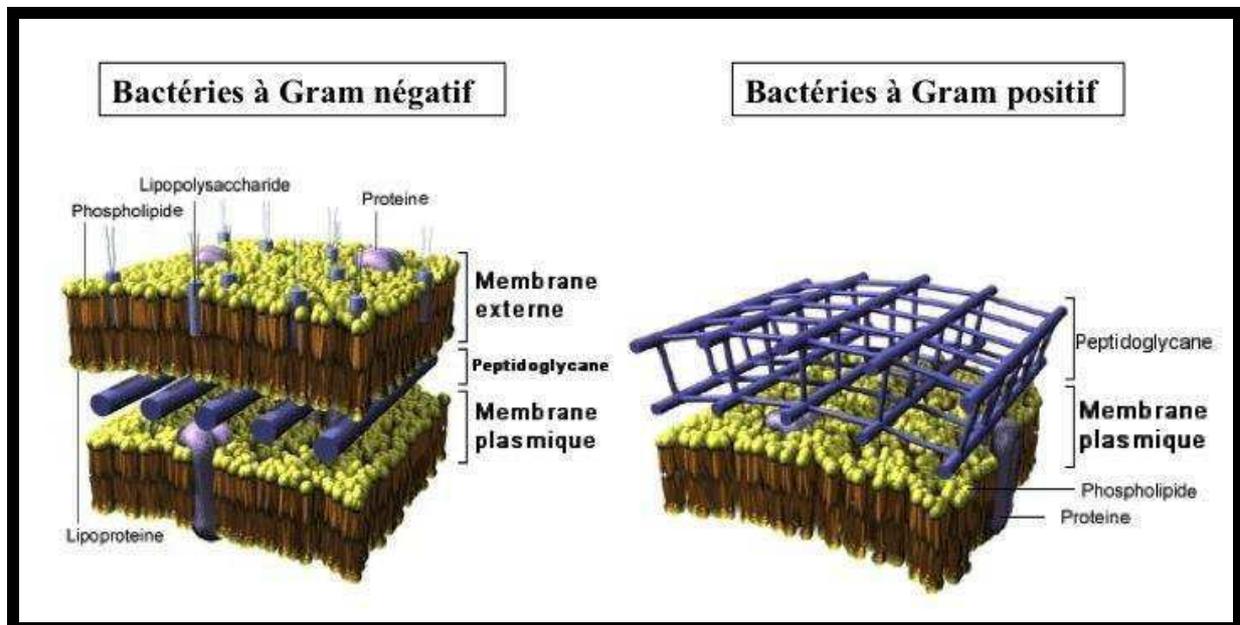


Figure 3. Structure de la paroi des bactéries

2.2. Mode d'action des β -lactamines

Les β -lactamines sont des antibiotiques bactéricides qui interfèrent avec la dernière étape périplasmique de la synthèse du peptidoglycane. Leurs cibles sont les transpeptidases et les carboxypeptidases, enzymes également appelées PLPs (protéines liant les pénicillines). La nature de ces PLPs est relativement spécifique d'espèce et leur nombre varie d'une espèce bactérienne à l'autre. La structure des β -lactamines mime la séquence D-ala-D-ala qui constitue le substrat naturel des PLPs. Les β -lactamines se fixent de façon covalente au niveau du site actif de l'enzyme par réaction d'acylation. La liaison PLP- β -lactamines ainsi

formée a deux conséquences : elle empêche la synthèse du peptidoglycane en inhibant la transglycosylation et la transpeptidation (effet bactériostatique) et elle entraîne une activation endogène des autolysines bactériennes (effet bactéricide).

3. MÉCANISMES DE RÉSISTANCE BACTÉRIENNE AUX β -LACTAMINES

On distingue quatre principaux mécanismes de résistance, chacun pouvant être lié aux caractéristiques génétiques d'une espèce bactérienne donnée (résistance naturelle) ou être acquis suite à des modifications génétiques (résistance acquise) :

- ✓ Défaut de pénétration de l'antibiotique : diminution de la perméabilité
- ✓ Modification de la cible : modification des PLPs
- ✓ Excrétion de l'antibiotique : efflux
- ✓ Inactivation de l'antibiotique : production de β -lactamases

3.1. Défaut de pénétration de l'antibiotique : diminution de la perméabilité

Ce mécanisme est lié à la structure de la paroi bactérienne et aux propriétés physico-chimiques de l'antibiotique.

Les bacilles à Gram négatif ont une paroi comprenant une membrane externe qui empêche la pénétration des antibiotiques hydrophobes et/ou de masse moléculaire élevée (pénicilline G, pénicilline M, macrolides, rifampicine, acide fusidique, vancomycine) entraînant une résistance naturelle à ces antibiotiques, le plus souvent à bas niveau. Les molécules hydrophiles de faible masse moléculaire peuvent tout de même traverser cette barrière hydrophobe en empruntant des canaux remplis d'eau formées par des protéines transmembranaires appelées porines (Figure 3).

Une modification qualitative ou quantitative des porines entraîne une diminution de la perméabilité membranaire et, par conséquent, une augmentation du niveau de résistance aux antibiotiques. Par exemple, une mutation dans la séquence du gène *ompF* codant pour une porine de *E. coli* entraîne une résistance aux β -lactamines (Harder et coll. 1981). De même, une réduction de l'expression du gène codant pour la porine OprD chez *P. aeruginosa* peut conduire à une résistance de ce germe à toutes les carbapénèmes, sans affecter les autres β -lactamines (Rodriguez-Martinez et coll. 2009).

3.2. Modification de la cible

Ce mécanisme de résistance aux β -lactamines est prédominant chez les bactéries à Gram positif. Les cibles des β -lactamines sont les PLPs, enzymes intervenant dans la synthèse du peptidoglycane. Certaines espèces expriment naturellement une PLP de faible affinité pour certains antibiotiques, comme la PLP5 des entérocoques vis-à-vis des céphalosporines et de l'oxacilline (Sauvage et coll. 2008). Des mutations au niveau des PLPs peuvent engendrer une perte d'affinité de l'antibiotique pour sa cible, entraînant une réduction de sensibilité aux β -lactamines sans affecter leur fonction dans l'élaboration du peptidoglycane (Hedge et coll. 1985).

D'autres espèces acquièrent un gène exogène codant pour une PLP insensible aux β -lactamines, comme le gène *mecA* codant pour la PLP2a acquis par *Staphylococcus aureus* et conférant à cette espèce une résistance à la méticilline et à toutes les β -lactamines (Sauvage et coll. 2008).

3.3. Excrétion de l'antibiotique : efflux

Les systèmes d'efflux sont basés sur une pompe insérée dans la membrane interne de la bactérie et capable d'excréter l'antibiotique hors de celle-ci grâce à un canal présent dans la membrane externe et à une protéine de jonction périplasmique. Cet efflux conduit à une diminution de la concentration intracellulaire de l'antibiotique et confère généralement des résistances de bas niveau.

Des systèmes d'efflux constitutifs ont été identifiés chez de nombreuses bactéries à Gram négatif. Ces mécanismes d'efflux actif ont été décrits à l'origine chez *E. coli* (McMurry et coll. 1980). Ils s'exercent vis-à-vis de nombreux antibiotiques dont la cible d'action est intracellulaire (quinolones, tétracyclines) et ils sont qualifiés de pompes d'efflux multi-drogues. Des mutations dans les régions régulatrices des opérons des systèmes d'efflux multi-drogues peuvent conduire à une surexpression des systèmes d'efflux constitutifs, associée ou non à une perte des porines, et conférer une multirésistance aux antibiotiques. Ainsi, l'hyperproduction du système MexAB-OprM est associée à la résistance au méropénème et à la ticarcilline chez *P. aeruginosa* (Poole. 2005). Une acquisition de gènes peut être à l'origine

de systèmes d'efflux spécifiques qui, contrairement aux systèmes d'efflux multi-drogues, ne permettent que l'exportation de molécules apparentées.

3.4. Inactivation enzymatique de l'antibiotique : production de β -lactamases

Ce mécanisme de résistance aux β -lactamines, prédominant chez les bactéries à Gram négatif, repose sur la production d'enzymes capables de se lier et d'inactiver l'antibiotique. Chez les bactéries à Gram positif, les β -lactamases sont excrétées alors que, chez les bactéries à Gram négatif, les β -lactamases restent localisées dans l'espace périplasmique.

L'origine des gènes codant ces enzymes peut être intrinsèque (gène naturellement présent sur le chromosome de l'espèce bactérienne) ou extrinsèque (gène transmis à la bactérie par des plasmides ou des éléments génétiques mobiles).

Certaines espèces sont naturellement résistantes aux aminopénicillines par production d'une β -lactamase naturelle : SHV chez *Klebsiella*, AmpC chez *A. baumannii*.

Certaines souches peuvent acquérir une résistance enzymatique soit par hyperproduction d'une enzyme naturellement peu ou pas exprimée (par exemple : céphalosporinase des entérobactéries du groupe 3 comme *Enterobacter*, *Serratia* ou *Morganella*), soit par acquisition d'un gène d'origine extrinsèque codant une β -lactamase.

CHAPITRE B : LES β -LACTAMASES

1. GÉNÉRALITÉS

La première description d'une enzyme capable d'inactiver la pénicilline date de 1940 (Abraham et coll. 1940). Depuis cette date, quelques temps après l'introduction de chaque nouvelle génération de β -lactamine, des mécanismes de résistance par inactivation de l'antibiotique venant d'être commercialisé ont été décrits. C'est ainsi que plusieurs centaines de β -lactamases ont été identifiées à ce jour dans diverses espèces bactériennes, pathogènes ou non.

Ces enzymes peuvent être classées en fonction de leur spectre d'activité enzymatique (Bush et coll. 1995, 2010) ou de leur séquence en acides aminés (Ambler. 1980).

1.1. Classifications

1.1.1. Classification de Ambler

Cette classification proposée en 1980 permet de grouper les β -lactamases en quatre classes en fonction de leurs homologies structurales (Ambler. 1980).

- ✓ **Les β -lactamases de classe A**, ou pénicillinases, constituent le groupe le plus important. Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines (amoxicilline, ticarcilline, pipéracilline) et sont sensibles aux inhibiteurs de β -lactamases (acide clavulanique, tazobactam).
- ✓ **Les β -lactamases de classe B**, ou métallo- β -lactamases, hydrolysent toutes les β -lactamines sauf l'aztréonam. Ces β -lactamases sont résistantes aux inhibiteurs de β -lactamases classiques mais sont inactivées *in vitro* par des agents chélateurs d'ions bivalents comme l'EDTA (acide éthylènediamine tétra-acétique).
- ✓ **Les β -lactamases de classe C**, ou céphalosporinases, hydrolysent préférentiellement les céphalosporines (céfalotine, ceftazidime, céfuroxime). Elles sont inhibées par la cloxacilline mais pas par les inhibiteurs de β -lactamases.

- ✓ **Les β -lactamases de classe D**, ou oxacillinases, constituent un groupe hétérogène. Elles sont caractérisées par une hydrolyse plus rapide de l'oxacilline et de la cloxacilline que de la benzylpénicilline. Les oxacillinases classiques sont inhibées *in vitro* par le chlorure de sodium.

Les β -lactamases appartenant aux classes A, C et D utilisent au sein de leur site actif une sérine intervenant dans leur processus catalytique, contrairement aux β -lactamases de classe B, dépourvues de cette sérine, qui utilisent un ou deux atomes de zinc et sont appelées pour cette raison métallo- β -lactamases.

1.1.2. Classification de Bush

La classification fonctionnelle de Bush, revue en 2010, est basée sur le phénotype de résistance aux β -lactamines. Elle prend en compte le profil de substrats et celui d'inhibition (Bush et coll. 1995, 2010).

- ✓ **Le groupe 1** correspond aux céphalosporinases appartenant à la classe C de Ambler.
- ✓ **Le groupe 2** comprend les β -lactamases des classes A et D de Ambler.
 - **2a** : pénicillinases à spectre restreint et pénicillinases des bactéries à Gram positif.
 - **2b** : β -lactamases hydrolysant les pénicillines et les céphalosporines de 1^{ère} génération, fortement inhibées par l'acide clavulanique et le tazobactam. Il comprend les enzymes de type TEM-1, TEM-2 et SHV-1.
 - **2be** : β -lactamases à spectre étendu (BLSE). En plus des caractéristiques du group 2b, ces enzymes hydrolysent les oxymino- β -lactamines comme le céfotaxime, la ceftazidime et l'aztréonam. Ces enzymes sont des BLSE dérivées de TEM-1, TEM-2, SHV-1, CTX-M par substitution d'acides aminés.
 - **2br** : enzymes à large spectre résistantes à l'acide clavulanique ($CI_{50} \geq 1 \mu M$).
 - **2ber** : enzymes TEM combinant un large spectre avec une résistance relative à l'acide clavulanique ($CI_{50} \geq 0.08 \mu M$). Enzymes également nommées CMT (Complexe mutant TEM).
 - **2c** : pénicillinases hydrolysant préférentiellement les carbénicillines.

- **2ce** : carbénicillines à spectre étendu vers le céfépime et le cefpirome (RTG-4, Potron et coll. 2009).
 - **2d** : correspond à la classe D de Ambler, contient les oxacillines inhibées par le chlorure de sodium.
 - **2de** : enzymes hydrolysant l'oxacilline et la cloxacilline avec un spectre étendu vers les céphalosporines.
 - **2df** : enzymes de type OXA hydrolysant les carbapénèmes très fréquentes chez *A. baumannii* (OXA-23, OXA-58).
 - **2e** : céphalosporinases capables d'hydrolyser les céphalosporines à large spectre inhibées par l'acide clavulanique et le tazobactam.
 - **2f** : enzyme de classe A hydrolysant les carbapénèmes (SME, KPC).
- ✓ **Le groupe 3** correspond à la classe B de Ambler.
- **3a** : métallo- β -lactamases plasmidiques (IMP, VIM).
 - **3b** : métallo- β -lactamases hydrolysant préférentiellement les carbapénèmes aux pénicillines et céphalosporines.

1.2. Mécanisme d'action des β -lactamases

Quelle que soit leur classe, ces β -lactamases catalysent la même réaction : ouverture du cycle β -lactame suivi d'une hydrolyse rapide de la β -lactamine. Les β -lactamases des classes A, C et D de Ambler sont des enzymes à sérine active qui utilisent au sein de leur site actif une sérine intervenant dans le processus catalytique. Les différentes phases de la réaction d'hydrolyse sont :

- Liaison non-covalente et réversible entre la β -lactamase et la β -lactamine
- Rupture du noyau β -lactame par acétylation covalente avec la sérine du site actif (formation d'un complexe acyl-enzyme intermédiaire avec les β -lactamines)
- Intervention d'une molécule d'eau permettant l'hydrolyse de l'acyl-enzyme pour réactiver la β -lactamase et libérer la molécule d'antibiotique inactivée.

De façon simplifiée, l'hydrolyse d'une β -lactamine se déroule en trois étapes caractérisées par des constantes cinétiques (Figure 4). Ces constantes permettent de définir le comportement enzymatique d'une β -lactamase vis-à-vis d'une β -lactamine donnée. Étendues

à différentes β -lactamines, elles permettent d'établir un profil d'hydrolyse propre à chaque enzyme sur lequel s'appuie la classification de Bush (Matagne et coll. 1990, 1998).

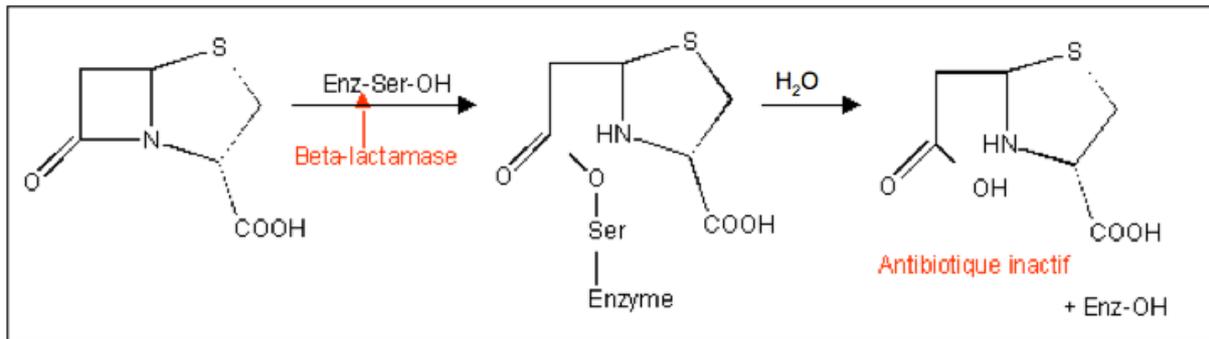


Figure 4. Mécanisme d'action simplifié des β -lactamases à sérine active.

2. Les oxacillines

Les oxacillines, enzymes à sérine active, correspondent à la classe D de Ambler et au groupe 2d de la classification de Bush. Bien que la plupart de ces enzymes hydrolysent plus rapidement l'oxacilline et la cloxacilline que la benzylpénicilline (Bush et coll. 1995), cette caractéristique dont leur nom est dérivé ne s'applique pas à toutes les β -lactamases de classe D. Cependant, toutes les β -lactamases de classe D hydrolysent les aminopénicillines et les carboxypénicillines.

Parmi les quatre classes de β -lactamases selon Ambler, les enzymes de classe D présentent la plus grande diversité, tant au niveau génétique que biochimique, avec des spectres d'hydrolyse pouvant être étroits ou larges selon l'enzyme étudiée (Naas et coll. 1999 ; Poirel et coll. 2010). A ce jour, plus de 200 oxacillines ont été décrites. Le support génétique des β -lactamases de classe D peut être chromosomique (Bou et coll. 2000 ; Bonnet et coll. 2002) ou plasmidique (Medeiros et coll. 1985 ; Aubert et coll. 2001). Cette localisation plasmidique ou sur des structures génétiques mobiles permet une large diffusion de ces gènes.

La numérotation des enzymes de classe D (DBL) (Joris et coll. 1991 ; Mossakowska et coll. 1989) a été établie pour étudier les structures moléculaires de ces enzymes, par analogie avec le système de numérotation des enzymes de classe A (Ambler 1991 ; Couture et coll. 1992). On identifie dans la structure primaire de ces enzymes certains éléments caractéristiques des oxacillines (Naas et coll. 1999) :

- ✓ La tétrade S-T-F-K comprenant la sérine active en position DBL 70
- ✓ La triade Y-G-N en position DBL 144 à 146
- ✓ Le motif W-X-E-X-X-L-X-I-S en position DBL 164 à 172
- ✓ Le motif Q-X-X-X-L en position DBL 176 à 180
- ✓ La triade K-T-G en position DBL 216 à 218

Les β -lactamases de classe D ne sont pas inhibées (à part à de très rares exceptions) par l'acide clavulanique, le tazobactam et le sulbactam, cependant leur activité peut être inhibée *in vitro* par le chlorure de sodium (NaCl). Cette propriété n'est pas partagée par les β -lactamases des autres classes, ce qui est une bonne caractéristique pour leur identification *in vitro*. Le NaCl ajouté à une concentration de 100 mM inhibe totalement l'activité de la majorité des β -lactamases de classe D (Girlich et coll. 2004a). Cette propriété n'est pas clairement expliquée, mais il semblerait que cette inhibition soit corrélée à la présence d'un résidu tyrosine en position 144. Des expériences de mutagenèse dirigée ont montré que le remplacement du résidu tyrosine par un résidu phénylalanine conférait une résistance à l'inhibition par le NaCl (Héritier et coll. 2003).

Le tableau 1 (page 17) résume les caractéristiques des oxacillinases présentées dans ce chapitre.

Tableau 1. Résumé des caractéristiques des principales oxacillines citées dans ce chapitre.

β-lactamase	Hôte d'origine	Support génétique	Spectre	Référence
OXA-1	<i>E. coli</i>	Plasmide, Transposon Tn2603	Restreint	Ouelette et coll. 1987
OXA-2	<i>S. typhimurium</i>	Plasmide, Transposon Tn2410	Restreint	Kratz et coll. 1983
OXA-5	<i>P. aeruginosa</i>	Plasmide, Transposon Tn1406	Restreint	Mdeiros et coll. 1985
OXA-9	<i>K. pneumoniae</i>	Plasmide, Transposon Tn1331	Restreint, inhibée par l'acide clavulanique	Bojorquez et coll. 1998
OXA-10	<i>P. aeruginosa</i>	Plasmide, Transposon Tn1404	Restreint	Huovinen et coll. 1988
OXA-12	<i>A. jandaei</i>	Chromosomique naturel	Restreint, inhibée par l'acide clavulanique	Alksne et coll. 1997
OXA-18	<i>P. aeruginosa</i>	Chromosomique acquis	Élargi aux céphalosporines	Philippon et coll. 1997
OXA-20	<i>A. baumannii</i>	Chromosomique acquis, intégron	Restreint	Naas et coll. 1998
OXA-21	<i>A. baumannii</i>	Plasmide, intégron	Restreint	Vila et coll. 1997
OXA-22	<i>R. pickettii</i>	Chromosomique naturel	Restreint	Girlich et coll. 1994
OXA-23	<i>A. baumannii</i>	Plasmide ou chromosomique Transposon Tn2006/Tn2007/Tn2008	Élargi aux carbapénèmes	Platon et coll. 1993
OXA-25	<i>A. baumannii</i>	Plasmide	Élargi aux carbapénèmes	Afzal-Shah et coll. 2001
OXA-26	<i>A. baumannii</i>	Plasmide	Élargi aux carbapénèmes	Afzal-Shah et coll. 2001
OXA-27	<i>A. baumannii</i>	Plasmide	Élargi aux carbapénèmes	Afzal-Shah et coll. 2001
OXA-31	<i>P. aeruginosa</i>	Plasmide, intégron	Élargi aux céphalosporines	Aubert et coll. 2001
OXA-40	<i>A. baumannii</i>	Chromosomique acquis	Élargi aux carbapénèmes	Bou et coll. 2000a
OXA-42	<i>B. pseudomallei</i>	Chromosomique naturel	Restreint	Niumsup et coll. 2002
OXA-47	<i>K. pneumoniae</i>	Plasmide, intégron	Restreint	Poirel et coll. 2004
OXA-48	<i>K. pneumoniae</i>	Plasmide, intégron	Élargi aux carbapénèmes	Poirel et coll. 2004
OXA-50	<i>P. aeruginosa</i>	Chromosomique naturel	Restreint	Girlich et coll. 2004a
OXA-51	<i>A. baumannii</i>	Chromosomique	Restreint	Brown et coll. 2005
OXA-53	<i>S. enterica</i>	Plasmide, intégron	Élargi aux céphalosporines	Mulvey et coll. 2004
OXA-55	<i>S. algae</i>	Chromosomique naturel	Restreint	Héritier et coll. 2004
OXA-58	<i>A. baumannii</i>	Plasmide	Élargi aux carbapénèmes	Poirel et coll. 2005
OXA-60	<i>R. pickettii</i>	Chromosomique naturel	Élargi aux carbapénèmes	Girlich et coll. 1994
OXA-61	<i>C. jejuni</i>	Chromosomique naturel	Restreint, non inhibée par NaCl	Alfredson et coll. 2005
OXA-62	<i>P. pnomemusa</i>	Chromosomique naturel	Restreint	Scoulica et coll. 1995
OXA-69	<i>A. baumannii</i>	Chromosomique naturel	Restreint	Héritier et coll. 2005b
OXA-72	<i>A. baumannii</i>	Plasmide	Élargi aux carbapénèmes	Wang et coll. 2007
OXA-96	<i>A. baumannii</i>	Plasmide	Élargi aux carbapénèmes	Koh et coll. 2007
OXA-143	<i>A. baumannii</i>	Plasmide	Élargi aux carbapénèmes	Higgins et coll. 2009
OXA-160	<i>A. baumannii</i>	Plasmide	Élargi aux carbapénèmes	Tian et coll. 2011
OXA-164	<i>A. baumannii</i>	Plasmide	Élargi aux carbapénèmes	Higgins et coll. 2010

Les oxacillines identifiées chez *A. baumannii* sont surlignées en gris.

2.1. Oxacillinases naturelles

De nombreuses espèces bactériennes possèdent de façon naturelle un gène codant une β -lactamase de classe D, couramment appelée oxacillinase, sur leur chromosome. Les gènes codant pour les oxacillinases OXA-42 et OXA-62 ont été mis en évidence respectivement sur les chromosomes de *Burkholderia pseudomallei* et de *Pandora ananatis* (Niamsup et Wuthiekanun, 2002 ; Scoulica et coll. 1995). Le gène *bla*_{OXA-61} a été identifié sur le chromosome de *Campylobacter jejuni* et code une β -lactamase à spectre étroit et non inhibée par le chlorure de sodium (Alfredson et coll. 2005). *Aeromonas jandaei* produit naturellement la β -lactamase de classe D OXA-12 (Alksne et coll. 1997). *Ralstonia pickettii* possède sur son chromosome deux gènes codant les oxacillinases OXA-22 et OXA-60 (Girlich et coll. 2004b). La présence de gènes chromosomiques *bla*_{OXA} a été authentifiée en particulier chez *Brachyspira pilosicoli* (Meziane-Cherif et coll. 2008), chez *Fusobacterium nucleatum* (Voha et coll. 2006), chez *Legionella gormanii* (Franceschini et coll. 2001) et *Achromobacter xylosoxydans* (Doi et coll. 2008). Le gène codant OXA-50 a été identifié chez *P. aeruginosa*, bien que sa contribution dans le phénotype de résistance de ce germe soit mineur (Girlich et coll. 2004a). Le gène codant OXA-55 a été identifié au sein du chromosome de *Shewanella algae* (Héritier et coll. 2004).

L'analyse du génome de l'isolat *A. baumannii* AYE a révélé la présence d'un gène codant l'oxacillinase OXA-69 (Héritier et coll. 2005a). OXA-69 présente 97% d'identité en acides aminés avec OXA-51, identifiée par la suite dans des isolats de *A. baumannii* en Argentine (Brown et coll. 2005). Il est probable que ces enzymes OXA-51/OXA-69 contribuent faiblement à la résistance naturelle aux antibiotiques observée chez *A. baumannii*.

Cependant, il a été évoqué que l'insertion en amont de ces gènes d'éléments génétiques mobiles, comme la séquence d'insertion IS*Aba1*, pourrait apporter des séquences promotrices en amont des gènes de type *bla*_{OXA-51}. L'oxacillinase, ainsi surexprimée, pourrait être à l'origine d'une diminution (acquise) de la sensibilité aux carbapénèmes observée dans certains isolats de *A. baumannii* (Turton et coll. 2006). De nombreux gènes de type *bla*_{OXA-51}, codant des dérivés de OXA-51/OXA-69, ont été identifiés à travers le monde (Poirel et coll. 2010).

2.2. Oxacillinases acquises à spectre restreint

Ces enzymes présentent généralement un profil de substrat limité : amino- et carboxypénicillines, oxacilline et cloxacilline, nitrocéphaline. Certaines enzymes sont capables d'hydrolyser d'autres substrats.

✓ Sous-groupe OXA-1

Le gène codant l'oxacillinase OXA-1 a été identifié sur un plasmide au sein d'un intégron dans de nombreuses bactéries à Gram négatif (Poirel et coll. 2010). OXA-1 et OXA-30 sont en fait la même enzyme puisque l'attribution d'un nom différent a résulté d'une erreur de séquençage (Ouellette et coll. 1987). OXA-1, comme la plupart des oxacillinases, hydrolyse les amino-, uréido- et carboxypénicillines et faiblement les céphalosporines à spectre étroit. OXA-1 semble être associée à la résistance de certains germes à Gram négatif (*E. coli*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp.) à l'ampicilline (Hanson et coll. 2002). De plus, le gène *bla*_{OXA-1} est souvent associé à des gènes codant pour des β -lactamase à spectre étendu (BLSE). En effet, des plasmides porteurs des gènes *bla*_{OXA-1} et *bla*_{CTX-M-1} ont été rapportés en Espagne (Costa et coll. 2007). Certains variants de l'oxacillinase OXA-1, comme OXA-47, possèdent également un spectre d'hydrolyse restreint. Le gène *bla*_{OXA-47} a été identifié sous forme de gènes cassette au sein d'un intégron sur un plasmide de *Klebsiella pneumoniae* isolé en Turquie et coproduisant OXA-48 (Poirel et coll. 2004). Le variant OXA-31 qui diffère de OXA-1 par deux substitutions en acides aminés, possède le même profil d'hydrolyse, y compris la capacité à hydrolyser le céfépime et le cefpirome (Aubert et coll. 2001). Aucun variant de OXA-1 capable d'hydrolyser la ceftazidime n'a été rapporté. Tous les gènes décrits comme appartenant au sous-groupe OXA-1 sont localisés sous forme de gènes cassettes au sein d'intégron de classe 1 (Poirel et coll. 2010).

✓ Sous-groupe OXA-2

OXA-2 est une β -lactamase à spectre restreint qui possède 30% d'identité en acides aminés avec OXA-1 (Kratz et coll. 1983). Le gène *bla*_{OXA-2} a été identifié chez de nombreuses espèces, notamment chez *P. aeruginosa* produisant la BLSE PER-1 (Empel et coll. 2009). Les variants OXA-3, OXA-15 et OXA-21, entre autres, font partie du sous-groupe OXA-2. Le

variant OXA-21 a été identifié une fois chez *A. baumannii* (Vila et coll. 1997a). Ces gènes codant pour ces enzymes ont aussi été localisés sous forme de gènes cassettes au sein d'intégron de classe 1 (Poirel et coll. 2010).

✓ **Sous-groupe OXA-10**

La β -lactamase OXA-10 (anciennement PSE-2) possède la capacité d'hydrolyser les céphalosporines : céfotaxime, ceftriaxone et aztréonam à de faibles niveaux, en épargnant la ceftazidime et les carbapénèmes (Huovinen et coll. 1988). Le gène codant pour cette enzyme a été identifié dans diverses espèces bactériennes à Gram négatif et représente le gène de type *bla*_{OXA} le plus souvent observé chez *P. aeruginosa*. De nombreux mutants de OXA-10 comme OXA-11, OXA-13 ou OXA-74 possèdent une augmentation de l'activité vers les céphalosporines à spectre étendu (Poirel et coll. 2010).

✓ **Autres sous-groupes**

D'autres oxacillinases sont faiblement reliées aux sous-groupes OXA-1, OXA-2 et OXA-10, et possèdent des propriétés particulières :

- **OXA-9** est inhibée par l'acide clavulanique et la cloxacilline et non par le chlorure de sodium (Bojorquez et coll. 1998). Le gène codant pour cette enzyme a été initialement caractérisé sur un plasmide de *K. pneumoniae* (Tolmasky et coll. 1993). Il a été rapporté depuis dans d'autres espèces bactériennes (*Pseudomonas* spp., *Enterobacter* spp.) en association avec les gènes d'autres β -lactamases de type carbapénémases (KPC, VIM, OXA-48) (Poirel et coll. 2010).

- **le gène *bla*_{OXA-5}** représente un autre sous-groupe des oxacillinases à spectre restreint et a été identifié sur un plasmide de *P. aeruginosa* en association avec le gène codant pour GES-2, une BLSE particulière aux propriétés de carbapénémase.

- **OXA-20** possède moins de 75% d'identité en acides aminés avec OXA-2 et a été identifiée en France et en Italie chez *A. baumannii* (Giordano et coll. 2007).

- **OXA-46** est inhibée par le tazobactam et carbapénèmes et faiblement par le NaCl (Giuliani et coll. 2005)

2.3. Oxacillinases acquises à spectre étendu

Certaines β -lactamases de classe D sont capables d'hydrolyser les céphalosporines de large spectre. Il s'agit soit des mutants ponctuels d'oxacillinases à spectre étroit, soit d'enzymes complètement différentes (Poirel et coll. 2010). La plupart de ces enzymes ont été identifiées chez *P. aeruginosa*.

Les mutants ponctuels dérivent de OXA-2, OXA-10 et OXA-13. Ces enzymes à spectre étendu sont codées par des gènes cassettes au sein de structure de type intégron. Ils sont notamment capables d'hydrolyser la ceftazidime.

OXA-18, isolée chez *P. aeruginosa*, ne partage que 50% d'identité en acides aminés et n'est pas reliée structurellement aux oxacillinases à spectre étroit (Philippon et coll. 1997). Elle confère un haut niveau de résistance aux céphalosporines et présente la particularité d'être inhibée par l'acide clavulanique. Des souches de *P. aeruginosa* produisant OXA-18 ont récemment été à l'origine d'épidémies en Belgique (Naas et coll. 2005).

OXA-45 a également été identifiée chez *P. aeruginosa* et partage un haut degré d'identité avec OXA-18 (66%) (Toleman et coll. 2003). OXA-53 a été récemment identifiée chez *S. enterica* au Brésil (Mulvey et coll. 2004). Elle partage 90% d'identité en acides aminés avec OXA-2, mais présente des propriétés particulières puisqu'elle est inhibée par l'acide clavulanique et confère une réduction de la sensibilité à la ceftazidime.

2.4. Oxacillinases à activité de carbapénémase : CHDLs

Certaines β -lactamases acquises du groupe D peuvent hydrolyser les carbapénèmes, elles sont nommées CHDLs (Carbapenem Hydrolysing class D β -Lactamases). Ces oxacillinases sont classées dans le groupe 2df de la classification de Bush. Aucune CHDL décrite à ce jour n'hydrolyse significativement les céphalosporines de large spectre ; ainsi, aucune β -lactamase de classe D ne combine à la fois des propriétés d'hydrolyse des céphalosporines de large spectre et des carbapénèmes. La plupart de ces enzymes ont été décrites chez *A. baumannii*. Les gènes codant ces enzymes ont un support chromosomique (Héritier et coll. 2005b) ou plasmidique (Donald et coll. 2000). Les CHDLs caractérisées montrent une faible hydrolyse pour les carbapénèmes, avec des valeurs de constantes catalytiques pour l'imipénème et le méropénème inférieur à 1 s^{-1} , avec une hydrolyse plus rapide et plus efficace pour l'imipénème. La valeur de la constante d'affinité pour ces substrats est basse, indiquant que

ces enzymes ont une forte affinité pour ces substrats (Héritier et coll. 2003 ; Poirel et coll. 2005). Du fait de ces caractéristiques particulières, la contribution réelle de ces enzymes à la résistance aux carbapénèmes a été discutée. Cependant, il a été montré par des expériences d'inactivation et de complémentation que les CHDLs comme OXA-23, OXA-40 et OXA-58, identifiées chez *A. baumannii*, contribuent significativement à la résistance de cette espèce aux carbapénèmes (Héritier et coll. 2005a).

Ces enzymes acquises ont été divisées en trois groupes selon leur identité en acides aminés.

✓ Groupe OXA-23

Le premier groupe comprend principalement l'oxacillinase OXA-23, identifiée pour la première fois en Ecosse (Paton et coll. 1993). OXA-23 partage 99% d'identité en acides aminés avec OXA-27, qui a été mise en évidence à Singapour (Afzal-Shah et coll. 2001). Ce groupe est traité plus en détails ci-après (paragraphe 2.5).

✓ Groupe OXA-40

Le deuxième groupe de CHDLs est constitué de OXA-25, OXA-26, OXA-40 et OXA-72. Ces enzymes diffèrent seulement par quelques substitutions en acides aminés et ce groupe ne partage que 60% d'identité en acides aminés avec le groupe OXA-23. OXA-40 a été initialement identifiée sur le chromosome d'un isolat de *A. baumannii* résistant aux carbapénèmes en Espagne (Bou et coll. 2000a). Le gène *bla*_{OXA-40} a depuis été mis en évidence dans divers pays comme le Portugal, l'Espagne, mais aussi les Etats-Unis (Da Silva et coll. 2004 ; Quinteira et coll. 2007 ; Ruiz et coll. 2007 ; Lolans et coll. 2006 ; Qi et coll. 2008). Ce gène présente un support chromosomique ou plasmidique (Quinteira et coll. 2007) et a été récemment identifié sur des plasmides de souches de *P. aeruginosa* résistantes aux carbapénèmes (Sevillano et coll. 2009). OXA-25 et OXA-26 sont des mutants ponctuels de OXA-40, ces enzymes ont été caractérisées à partir d'isolats de *A. baumannii* en provenance d'Espagne et de Belgique (Afzal-Shah et coll. 2001). OXA-72 a été identifiée dans des isolats de *A. baumannii* de Chine (Wang et coll. 2007), Corée du Sud (Lee et coll. 2009), Taiwan (Lu et coll. 2009) et Bahreïn (Mugnier et coll. 2009). OXA-160, un nouveau variant de OXA-40 par substitution P227S, a récemment été identifié dans une souche de *A. baumannii* isolée aux Etats-Unis (Tian et coll. 2011).

✓ Groupe OXA-58

Le troisième groupe ne partage que 48% d'identité en acides aminés avec les deux autres groupes. Il est représenté par l'oxacillinase OXA-58. Ce gène a été initialement localisé sur un plasmide chez *A. baumannii* (Poirel et coll. 2005). Depuis, il a été identifié dans le monde entier : Europe (Coelho et coll. 2006), Argentine (Merkier et coll. 2008), Australie (Peleg et coll. 2006) et Etats-Unis (Castanheira et coll. 2008), ainsi que dans d'autres espèces de *Acinetobacter*, comme *A. junii* en Roumanie (Marqué et coll. 2005), *Acinetobacter phenon6/ct13TU* et *Acinetobacter genomic species 3* en Espagne (Marti et coll. 2008a et 2008b). OXA-97 est un mutant ponctuel de OXA-58. Elle partage les mêmes propriétés et a été identifiée à partir d'un isolat de *A. baumannii* en Tunisie (Poirel et coll. 2008). OXA-96 et OXA-164 sont également des mutants ponctuels de OXA-58, identifiés dans des isolats de *A. baumannii* respectivement à Singapour (Koh et coll. 2007) et en Allemagne (Higgins et coll. 2010).

✓ OXA-143

Une nouvelle CHDL a été récemment décrite, il s'agit de OXA-143, identifiée à partir d'un isolat de *A. baumannii* du Brésil (Higgins et coll. 2009). Elle partage 88% d'identité en acides aminés avec OXA-40, 63% avec OXA-23 et 53% avec OXA-58. Elle pourrait correspondre à un nouveau sous-groupe de CHDLs. Son activité hydrolytique est comparable à celles de OXA-23 et OXA-58.

✓ OXA-48

OXA-48 a été identifiée à partir d'un isolat de *K. pneumoniae* en Turquie (Poirel et coll. 2004). OXA-48 hydrolyse les pénicillines et également l'imipénème, en épargnant les céphalosporines à spectre large. Il s'agit de la β -lactamase du groupe D ayant la plus grande propriété catalytique vis-à-vis de l'imipénème (k_{cat} autour de 2 s^{-1}) (Poirel et coll. 2004). Elle partage moins de 46% d'identité en acides aminés avec les autres β -lactamases du groupe D et une faible identité avec OXA-23 et OXA-40 (36 et 32%, respectivement). Ce gène, localisé sur un plasmide, a également été identifié chez *E. coli* (Gülmez et coll. 2008) et *Citrobacter freundii* (Nazic et coll. 2005) mais pas chez *A. baumannii*.

2.5. Oxacillinase OXA-23

OXA-23, initialement dénommée ARI-1 « *Acinetobacter* Resistant Imipenem-1 », a été identifiée pour la première fois en Ecosse (Paton et coll. 1993 ; Donald et coll. 2000). Ce gène, porté par un plasmide, est transférable vers *A. junii* (Scaife et coll. 1995). La capacité de OXA-23 à hydrolyser les carbapénèmes est relativement faible. Cependant, cette hydrolyse est significative en comparaison avec celles observées avec d'autres β -lactamases de classe D et a permis de définir un nouveau sous-groupe d'oxacillinases nommé CHDLs (Poirel et coll. 2006). La figure 5 présente une souche de référence de *A. baumannii* sans et avec un plasmide naturel porteur du gène *bla*_{OXA-23}.

OXA-23 est faiblement reliée aux autres β -lactamases de classe D avec seulement 36% d'identité en acides aminés avec OXA-5 et OXA-10. Ce gène a été identifié à travers le monde uniquement chez *Acinetobacter* spp. à l'exception d'un isolat de *Proteus mirabilis* rapporté en France qui possédait le gène *bla*_{OXA-23} sur son chromosome (Bonnet et coll. 2002). Ce gène a également été identifié dans une souche de *A. baumannii* environnementale (Girlich et coll. 2010). Ce gène a été identifié dans de nombreux pays à travers le monde. La carte ci-dessous (Figure 6) montre les différents pays où une épidémie de *A. baumannii* producteur de l'oxacillinase OXA-23 a été rapportée.

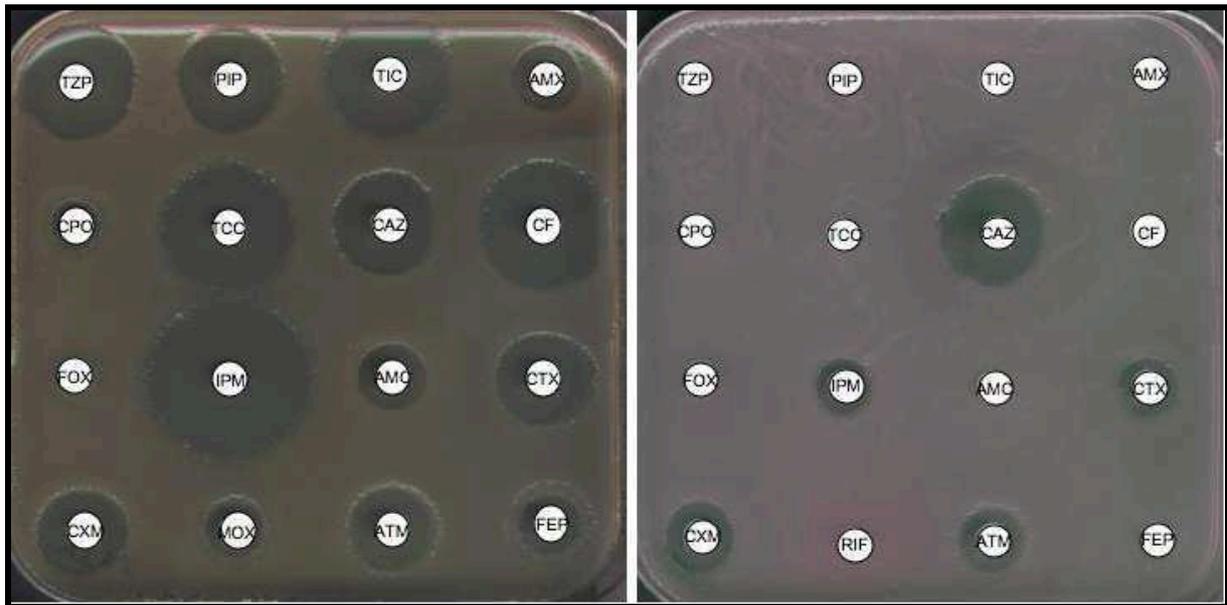


Figure 5. Contribution du gène *bla*_{OXA-23} dans le phénotype de résistance de *A. baumannii*.

A gauche, la souche de référence A. baumannii BM4547.

*A droite la souche A. baumannii BM4547 avec un plasmide naturel porteur du gène *bla*_{OXA-23}.*

AMX : amoxicilline ; TIC : ticarcilline ; PIP : pipéracilline ; TZP : pipéracilline + tazobactam ; CF : céfalotine ; CAZ : ceftazidime ; TCC : ticarcilline + acide clavulanique ; CPO : ceftiofime ; CTX : céfotaxime ; AMC : amoxicilline + acide clavulanique ; IMP : imipénème ; FOX : céfoxitine ; CXM : céfuroxime ; MOX ; moxalactam ; ATM : aztréonam ; FEP : céfépime ; RIF : rifampicine.



Figure 6. Cartographie de la dissémination mondiale du gène *bla*_{OXA-23}, juillet 2011.

Détail des pays : France (Garlantezec et coll. 2011) ; Italie (Mezzatesta et coll. 2011 , D'Arezzo et coll. 2011) ; Iraq (Kusradze et coll. 2011) ; Pakistan (Irfan et coll. 2011) ; Brésil (Ferreira et coll. 2011 , Grosso et coll. 2011) ; Inde (Karunasaga et coll. 2011 , Roy et coll. 2010) ; Madagascar (Andriamanantena et coll. 2010) ; Taiwan (Lin et coll. 2010); Chine (Fu et coll. 2010) (He et coll. 2011); Hong Kong (Ho et coll. 2010); Brésil (Schimith Bier et coll. 2010); Corée (Yang et coll. 2010); Chine (Yan et coll. 2010); Angleterre (Livermore et coll. 2010); France (Girlich et coll. 2010); Singapour (Lim et coll. 2009); Allemagne (Kohlenberg et coll. 2009); Ohio, USA (Sirmivasan et coll. 2009); Italie (Mendes et coll. 2009b); Thaïlande (Niumsup et coll. 2009); Bulgarie (Stoeva et coll. 2009); Irlande (Boo et coll. 2009); Tunisie (Mansour et coll. 2008); Turquie (Gur et coll. 2008); Asie Pacifique (Mendes et coll. 2009a); Nouvelle Calédonie (Le Hello et coll, 2008); Belgique (Bogaerts et coll. 2008); Iran (Feizabadi et coll. 2008); Illinois, USA (Qi et coll. 2008); Pennsylvanie, USA (Doi et coll. 2007); Afrique du sud (Segal et coll. 2007); Colombie (Villegas et coll. 2007); Algérie, Vietnam, Libye, Roumanie (Corvec et coll. 2007); Polynésie Française (Naas et coll. 2005); Ecosse, (Donald et coll. 2000).

Tableau 1. Résumé des caractéristiques des principales oxacillinasés citées dans ce chapitre.

β-lactamase	Hôte d'origine	Support génétique	Spectre	Référence
OXA-1	<i>E. coli</i>	Plasmide, Transposon Tn2603	Restreint	Ouelette et coll. 1987
OXA-2	<i>S. typhimurium</i>	Plasmide, Transposon Tn2410	Restreint	Kratz et coll. 1983
OXA-5	<i>P. aeruginosa</i>	Plasmide, Transposon Tn1406	Restreint	Mdeiros et coll. 1985
OXA-9	<i>K. pneumoniae</i>	Plasmide, Transposon Tn1331	Restreint, inhibée par l'acide clavulanique	Bojorquez et coll. 1998
OXA-10	<i>P. aeruginosa</i>	Plasmide, Transposon Tn1404	Restreint	Huovinen et coll. 1988
OXA-12	<i>A. jandaei</i>	Chromosomique naturel	Restreint, inhibée par l'acide clavulanique	Alksne et coll. 1997
OXA-18	<i>P. aeruginosa</i>	Chromosomique acquis	Élargi aux céphalosporines	Philippon et coll. 1997
OXA-20	<i>A. baumannii</i>	Chromosomique acquis, intégron	Restreint	Naas et coll. 1998
OXA-21	<i>A. baumannii</i>	Plasmide, intégron	Restreint	Vila et coll. 1997
OXA-22	<i>R. pickettii</i>	Chromosomique naturel	Restreint	Girlich et coll. 1994
OXA-23	<i>A. baumannii</i>	Plasmide ou chromosomique Transposon Tn2006/Tn2007/Tn2008	Élargi aux carbapénèmes	Platon et coll. 1993
OXA-25	<i>A. baumannii</i>	Plasmide	Élargi aux carbapénèmes	Afzal-Shah et coll. 2001
OXA-26	<i>A. baumannii</i>	Plasmide	Élargi aux carbapénèmes	Afzal-Shah et coll. 2001
OXA-27	<i>A. baumannii</i>	Plasmide	Élargi aux carbapénèmes	Afzal-Shah et coll. 2001
OXA-31	<i>P. aeruginosa</i>	Plasmide, intégron	Élargi aux céphalosporines	Aubert et coll. 2001
OXA-40	<i>A. baumannii</i>	Chromosomique acquis	Élargi aux carbapénèmes	Bou et coll. 2000a
OXA-42	<i>B. pseudomallei</i>	Chromosomique naturel	Restreint	Niumsup et coll. 2002
OXA-47	<i>K. pneumoniae</i>	Plasmide, intégron	Restreint	Poirel et coll. 2004
OXA-48	<i>K. pneumoniae</i>	Plasmide, intégron	Élargi aux carbapénèmes	Poirel et coll. 2004
OXA-50	<i>P. aeruginosa</i>	Chromosomique naturel	Restreint	Girlich et coll. 2004a
OXA-51	<i>A. baumannii</i>	Chromosomique	Restreint	Brown et coll. 2005
OXA-53	<i>S. enterica</i>	Plasmide, intégron	Élargi aux céphalosporines	Mulvey et coll. 2004
OXA-55	<i>S. algae</i>	Chromosomique naturel	Restreint	Héritier et coll. 2004
OXA-58	<i>A. baumannii</i>	Plasmide	Élargi aux carbapénèmes	Poirel et coll. 2005
OXA-60	<i>R. pickettii</i>	Chromosomique naturel	Élargi aux carbapénèmes	Girlich et coll. 1994
OXA-61	<i>C. jejuni</i>	Chromosomique naturel	Restreint, non inhibée par NaCl	Alfredson et coll. 2005
OXA-62	<i>P. pnomemusa</i>	Chromosomique naturel	Restreint	Scoulica et coll. 1995
OXA-69	<i>A. baumannii</i>	Chromosomique naturel	Restreint	Héritier et coll. 2005b
OXA-72	<i>A. baumannii</i>	Plasmide	Élargi aux carbapénèmes	Wang et coll. 2007
OXA-96	<i>A. baumannii</i>	Plasmide	Élargi aux carbapénèmes	Koh et coll. 2007
OXA-143	<i>A. baumannii</i>	Plasmide	Élargi aux carbapénèmes	Higgins et coll. 2009
OXA-160	<i>A. baumannii</i>	Plasmide	Élargi aux carbapénèmes	Tian et coll. 2011
OXA-164	<i>A. baumannii</i>	Plasmide	Élargi aux carbapénèmes	Higgins et coll. 2010

Les oxacillinasés identifiées chez *A. baumannii* sont surlignées en gris.

3. Les Métallo- β -Lactamases (MBLs)

3.1. Généralités

Les métallo- β -lactamases, MBLs, correspondent à la classe B de la classification structurale de Ambler et au groupe 3 de la classification fonctionnelle de Bush. Leur site actif contient un ou deux ions zinc, à la différence des autres β -lactamases dites à sérine active. Elles possèdent un spectre d'hydrolyse variable selon l'enzyme, qui peut inclure toutes les β -lactamines sauf les monobactams (aztréonam). Elles ne sont pas inactivées par les inhibiteurs classiques des β -lactamases, mais sont inhibées *in vitro* par l'EDTA. Elles ont été découvertes dans les années 1960, initialement dans des espèces peu pathogènes (Cornagliart coll. 2011). Certaines MBLs sont codées par des gènes naturellement présents sur le chromosome de certaines bactéries comme *S. maltophilia*, *Bacillus* spp., *B. fragilis*, quelques espèces de *Aeromonas* et de flavobactéries.

D'autres MBLs ont été acquises et identifiées dans des espèces comme les Enterobacteriaceae, *P. aeruginosa* et *A. baumannii*.

Au moins 9 types différents de MBLs acquises ont été décrits à ce jour (Figure 7). Les déterminants MBLs les plus importants sont les dérivés de type IMP, VIM, SPM et NDM. Un des derniers déterminants décrits, NDM-1 (New-Delhi Métallo- β -Lactamase), a notamment largement été médiatisé et son importante capacité de dissémination cause un réel problème de santé publique (Rolain et coll. 2010).

L'origine de ces MBLs est inconnue à ce jour mais des bactéries de l'environnement pourraient en être la source. La dissémination des gènes codant pour des MBLs est basée sur la mobilisation d'éléments génétiques mobiles, notamment sous forme de gènes cassettes portés par des intégrons.

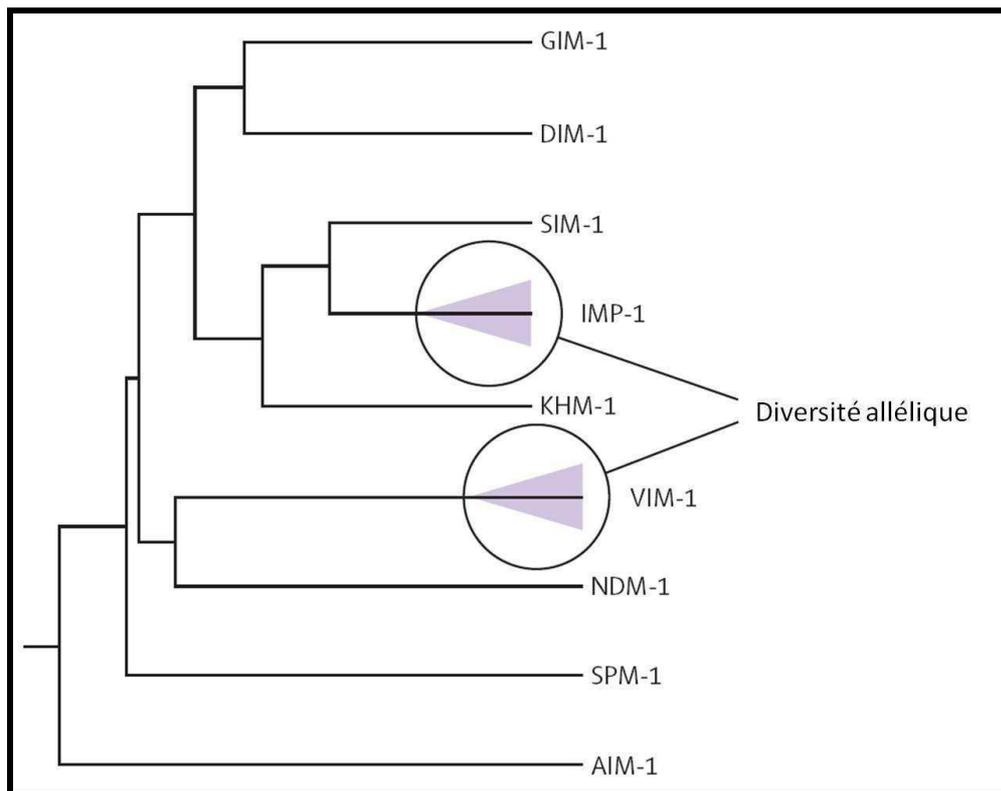


Figure 7. Les différents types de métallo-β-lactamases (MBLs). D’après Cornaglia et coll. 2011. Le dendrogramme montre la diversité et les relations structurales entre les différents types de MBLs. Les aires grisées autour des enzymes de type IMP et VIM indiquent l’existence de plusieurs variants au sein de ces groupes.

3.2. Les MBLs de type VIM

Les enzymes de type VIM ont été découvertes en Europe à la fin des années 1990 et ont été identifiées depuis dans le monde entier (Lauretti et coll. 1999). Plus de 20 variants de type VIM ont été décrits (Figure 8). Ces déterminants ont d’abord été identifiés chez *P. aeruginosa*, puis ont disséminé vers les Enterobacteriaceae. Certains déterminants ont aussi été décrits chez *A. baumannii* : VIM-1 en Grèce (Tsakris et coll. 2006), VIM-2 en Corée (Yum et coll. 2002), VIM-3 (Lee et coll. 2008) et VIM-11 (Lin et coll. 2010) à Taiwan. Les enzymes de type VIM peuvent hydrolyser toutes les β-lactamines, y compris les carbapénèmes, sauf les monobactams.

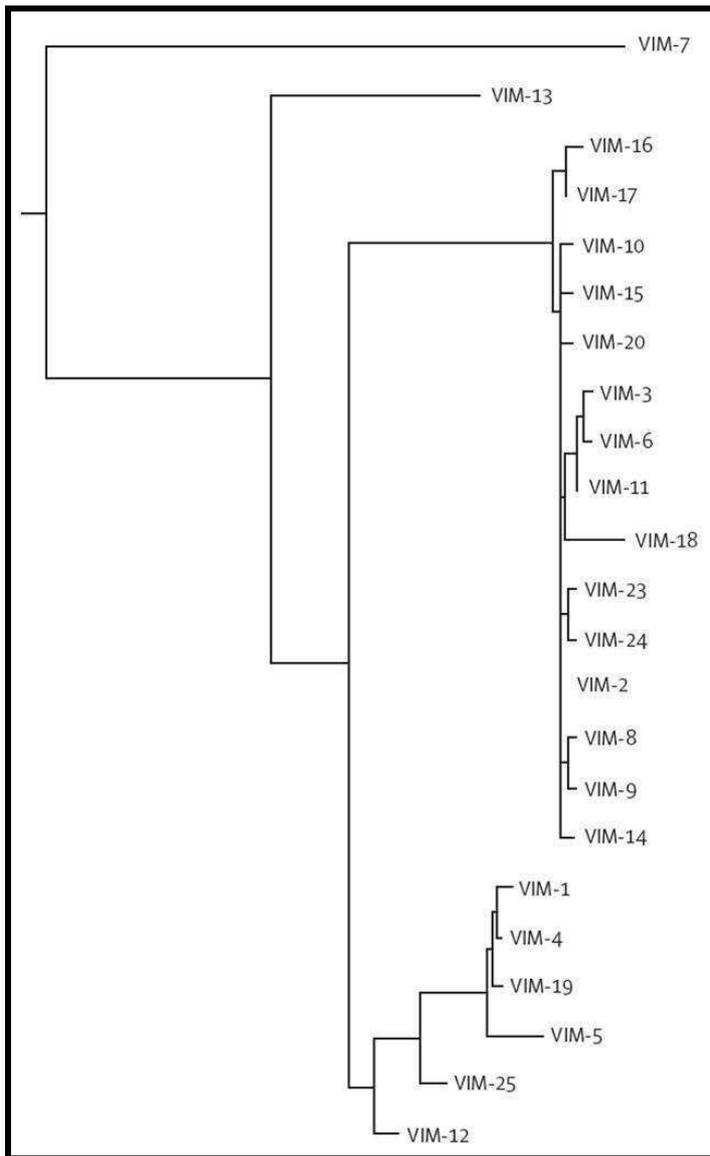


Figure 8. Les différents déterminants de type VIM. D'après Cornaglia et coll. 2011.

Le dendrogramme montre la diversité et les relations structurales entre les différents variants de type VIM.

Chapitre C: *Acinetobacter* spp.

1. Taxonomie

L'histoire du genre *Acinetobacter* débute au début du XX^{ème} siècle avec la description par un microbiologiste néerlandais d'un microorganisme dénommé *Micrococcus calcoaceticus* isolé à partir de prélèvement de sol (Beijerinck. 1911). C'est en 1954 que Brisou et Prévost proposent la désignation du genre *Acinetobacter* (du grec *akinetos* : « incapable de bouger ») pour regrouper une collection hétérogène de bactéries immobiles, à coloration de Gram négative et à réaction d'oxydase positive ou négative (Brisou et coll. 1954). Dans son édition de 1974, le *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* listait le genre *Acinetobacter* avec la description d'une seule espèce : *Acinetobacter calcoaceticus*. Une avancée majeure dans l'histoire du genre *Acinetobacter* a été réalisée en 1986 grâce aux techniques d'hybridation ADN/ADN de Bouvet et Grimont qui sont parvenus à distinguer 12 espèces génomiques ou genomic species, certaines étant clairement dénommées comme *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter johnsonii*, *Acinetobacter junii* et *Acinetobacter lwoffii* (Bouvet et coll. 1987). Les travaux réalisés par Bouvet et Jeanjean (1989), Tjernberg et Ursing (1989), et Nishimura et coll. (1988) ont abouti à la description d'autres espèces incluant *Acinetobacter radioresistens*, qui correspond à *Acinetobacter* genomic species 12 décrit par Bouvet et Grimont. Certaines espèces se sont révélées être synonymes comme *A. lwoffii* et *Acinetobacter* genomic species 9 ou *Acinetobacter* genomic species 14 décrit par Bouvet et Jeanjean (14BJ) et *Acinetobacter* genomic species 13 décrit par Tjernberg et Ursing (13TU) (Peleg et coll. 2008). Plus récemment, d'autres espèces bactériennes ont été décrites chez l'homme comme *Acinetobacter parvus*, *Acinetobacter schindleri* et *Acinetobacter ursingii* (Nemec et coll. 2001 et 2003) ou dans l'environnement (bassins de décontamination) comme *Acinetobacter baylyi*, *Acinetobacter bouvetii*, *Acinetobacter grimontii*, *Acinetobacter tjernbergiae*, *Acinetobacter townneri*, *Acinetobacter tandoii* et *Acinetobacter gernerii* (Carr et coll. 2003). A ce jour, 33 espèces bactériennes de *Acinetobacter* ont été décrites, dont 18 ont un nom d'espèce propre (Tableau 2). Leur contenu ADN en G+C est compris entre 39 et 47%. Tout dernièrement, de nouvelles espèces de *Acinetobacter* spp. ont été décrites en pathologie humaine : *Acinetobacter septicus* sp. nov. (Kilic et coll. 2008), *Acinetobacter beijerinckii* sp. nov. et *Acinetobacter gyllenbergii* sp. nov. (Nemec et coll. 2009) ou dans l'environnement :

Acinetobacter oleivorans sp.nov (Kang et coll. 2011), *Acinetobacter rudis* sp. nov. (Vaz-Moreira et coll. 2011), *Acinetobacter kyonggiensis* sp. nov. (Lee et coll. 2010), *Acinetobacter brisouii* sp. nov. (Anandham et coll. 2010), *Acinetobacter venetianus* sp. nov. (Vaneechoutte et coll. 2009) *Acinetobacter antiviralis* sp. nov. (Lee et coll. 2009), *Acinetobacter soli* sp. nov. (Kim et coll. 2008), *Acinetobacter marinus* sp. nov. et *Acinetobacter seohaensis* sp. nov (Yoon et coll. 2007). De plus, certains auteurs ont proposé de nommer les espèces ne portant pas de dénomination propre : *Acinetobacter* genomic species 3 (*A. pittii* sp. nov.), *Acinetobacter* genomic species 13TU (*A. nosocomialis* sp. nov.), *Acinetobacter* genomic species 10 (*Acinetobacter bereziniae* sp. nov.), *Acinetobacter* genomic species 11 (*Acinetobacter guillouiae* sp. nov.) (Nemec et coll. 2011 et 2010).

Le genre *Acinetobacter* est actuellement défini comme appartenant à la famille des *Moraxellaceae* au sein de l'ordre *Gammaproteobacteria* et qui regroupe les genres *Moraxella*, *Acinetobacter* et *Psychrobacter*.

Certaines espèces décrites ci-dessus sont très proches et difficiles à distinguer, notamment *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *Acinetobacter* genomic species 3, et *Acinetobacter* genomic species 13TU qui sont regroupées sous le terme de complexe *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* (Peleg et coll. 2008).

2. Diagnostic d'espèce

La culture des espèces du genre *Acinetobacter* est possible sur la plupart des milieux utilisés en routine au laboratoire de microbiologie. *A. haemolyticus* et d'autres espèces moins précisément définies, comme *Acinetobacter* genomic species 6, 13BJ, 14BJ, 15BJ, 16, et 17, peuvent montrer une hémolyse sur gélose au sang, une propriété jamais mise en évidence pour le complexe *A. calcoaceticus*-*A. baumannii*. Certains milieux de culture ont été proposés pour optimiser l'isolement de *Acinetobacter* spp. (milieu de Leeds, milieu Herellea (Jawad et coll. 1994). Une température d'incubation de 37°C permet la culture de la plupart des souches, alors qu'une température de 44°C permet classiquement l'isolement sélectif de l'espèce *A. baumannii* (Bouvet et coll. 2000).

La méthode de référence pour le diagnostic d'espèce chez *Acinetobacter*, décrite par Bouvet et Grimont dans les années 1980 (Bouvet et coll. 1987) et associant une hybridation ADN/ADN avec une série de 26 tests phénotypiques, est contraignante et indisponible dans de nombreux laboratoires. Les systèmes d'identification manuels ou semi-automatisés couramment utilisés comme API 20NE, Vitek 2, Phoenix, et MicroScan WalkAway systems,

ne permettent pas de distinguer précisément toutes les espèces de *Acinetobacter*, en particulier celles du complexe *A. calcoaceticus*-*A. baumannii*. C'est pourquoi beaucoup d'infections rapportées à *A. baumannii* peuvent avoir été causées par d'autres espèces de ce complexe.

Des méthodes moléculaires ont été développées pour le diagnostic d'espèce chez *Acinetobacter* : analyse par restriction du gène codant pour l'ARNr 16S amplifié (ARDRA) (Vaneechoutte et coll. 1995), analyse du polymorphisme de longueur de fragments amplifiés (AFLP) (Janssen et coll. 1997 ; Nemeč et coll. 2001), ribotypage (Gerner-Smidt et coll. 1992), tRNA spacer fingerprinting (Ehrenstein et coll. 1996), analyse de séquences des espaces intergéniques entre les gènes ARNr 16S et 23S obtenues après restriction (Dolzani et coll. 1995) ou non (Chang et coll. 2005), et le séquençage du gène *rpoB* (RNA polymérase β -subunit) et de son environnement (La Scola et coll. 2004). Les analyses de type ARDRA et AFLP sont les méthodes les plus acceptées et les plus validées. D'autres méthodes basées sur des techniques de PCR ayant pour but soit la détection du gène *bla*_{OXA-51} codant l'oxacilline intrinsèque de *A. baumannii* soit l'analyse des gènes *gyrB* pour distinguer *A. baumannii* de *Acinetobacter* genomospecies 13TU (Higgins et coll. 2007) ont été développées.

Des résultats prometteurs ont été obtenus avec la technique de Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time-Of-Flight MS (MALDI-TOF) pour l'identification de 552 souches bien caractérisées de *Acinetobacter* représentant 15 espèces différentes (Peleg et coll. 2008).

3. Morphologie, métabolisme et habitat

Les bactéries du genre *Acinetobacter* sont des bacilles ou coccobacilles à coloration de Gram négative, aérobies strictes, catalase-positives et oxydase-négatives, immobiles, non fermentant, non sporulées de 1 μ m de diamètre et dont la longueur varie de 1 μ m (forme coccoïde) à 5 μ m (forme bacillaire) ou plus (forme filamenteuse).

Les bactéries du genre *Acinetobacter* sont considérées ubiquitaires et peuvent être isolées dans l'environnement (sols, eaux). Elles font aussi partie de la flore commensale de la peau chez l'homme puisque une étude épidémiologique a révélé la présence d'une colonisation cutanée à *Acinetobacter* spp. chez 43% de sujets non hospitalisés (Seifert et coll. 1997). Les espèces les plus fréquemment isolées étaient : *A. lwoffii* (58%), *A. johnsonii* (25%), *A. junii* (10%) et *Acinetobacter* genomic species 3 (6%). Une étude similaire a montré un taux de portage cutané de 44% chez des patients volontaires sains avec principalement *A. lwoffii* (61%), *Acinetobacter* genomic species 15BJ (12%), *A. radioresistens* (8%) et *Acinetobacter*

genomospecies 3 (5%) (Berlau et coll. 1999). Ce taux de portage cutané atteignait 75% chez des patients hospitalisés (Seifert et coll. 1997). Dijkshoorn et al. ont montré un taux de portage fécal de 25% de *Acinetobacter* chez des volontaires sains, principalement *A. johnsonii* et *Acinetobacter* genomic species 11 (Dijkshoorn et coll. 2005). Paradoxalement, *A. baumannii*, l'espèce la plus fréquemment responsable d'infections nosocomiales au sein du genre *Acinetobacter*, n'a été isolée que très rarement sur la peau (respectivement 0.5% et 3% pour Berlau et coll. 1999 et Seifert et coll. 1997) et dans les selles humaines (0.8% pour Dijkshoorn et coll. 2005). *Acinetobacter* genomic species 13TU, deuxième espèce d'importance clinique, n'a de même jamais été isolée dans toutes ces études.

Chez l'animal, *A. baumannii* a été occasionnellement responsable d'infections (Vanechoutte et coll. 2000 ; Francey et coll. 2000) et *A. parvus* a été isolé chez le chien (Peleg et coll. 2008).

Dans les végétaux, les espèces les plus fréquemment isolées sont *A. baumannii* et *Acinetobacter* genomic species 11 ainsi que *A. calcoaceticus* and *Acinetobacter* genomic species 3 (Berlau et coll. 1999b).

Au sein du genre *Acinetobacter*, *A. baumannii* est l'espèce la plus fréquemment rencontrée en milieu hospitalier, où elle est la cause d'un nombre important d'infections nosocomiales (Bergogne-Berezin et coll. 1996).

Tableau 2. Description des espèces appartenant au genre *Acinetobacter*.

Espèce	Genomic species ^a	Souche de référence	Lieu d'identification
<i>A. baumannii</i>	2	ATCC 19606	environnement / homme
<i>A. baylyi</i>		DSM 14961	environnement
<i>A. bouvetii</i>		DSM 14964	environnement
<i>A. calcoaceticus</i>	1	ATCC 23055	environnement
<i>A. gernerii</i>		DSM 14967	environnement
<i>A. grimontii</i>		DSM 14968	environnement
<i>A. haemolyticus</i>	4	ATCC 17906	environnement / homme
<i>A. johnsonii</i>	7	ATCC 17909	environnement / homme
<i>A. junii</i>	5	ATCC 17908	homme
<i>A. lwoffii</i>	8/9	ACTC 15309	homme
		ATCC 9957	
<i>A. parvus</i>		NIPH384	homme / chien
<i>A. radioresistens</i>	12	IAM 13186	environnement / homme
<i>A. schindleri</i>		NIPH1034	homme
<i>A. tandoii</i>		DSM 14970	environnement
<i>A. tjernbergiae</i>		DSM 14971	environnement
<i>A. townneri</i>		DSM 14962	environnement
<i>A. ursingii</i>		NIPH137	homme
<i>A. pittii</i> sp. nov. ^b	3	ATCC 19004	environnement / homme
	6	ATCC 17979	
<i>Acinetobacter bereziniae</i> sp. nov. ^b	10	ATCC 17924	
<i>Acinetobacter guillouiae</i> sp. nov. ^b	11	ATCC 11171	environnement / homme
<i>A. nosocomialis</i> sp. nov. ^b	13TU	ATCC 17903	homme
	13BJ, 14TU	ATCC 17905	
	14BJ	CCUG 14816	
	15BJ	SEIP 23.78	
	15TU	M 151a	
	16	ATCC 17988	
	17	SEIP Ac87.314	
	Between 1 and 3	10095	
	Close to 13TU	10090	

^aLes espèces génomiques (genomic species) sont définies d'après Bouvet et Grimont et Bouvet et Jeanjean. De nouvelles espèces de *Acinetobacter* spp. ont été décrites : *Acinetobacter septicus* sp. nov. (Kilic et coll. 2008) ; *Acinetobacter beijerinckii* sp. nov. et *Acinetobacter gyllenbergii* sp. nov. (Nemec et coll. 2009) ; *Acinetobacter oleivorans* sp. nov. (Kang et coll. 2011) ; *Acinetobacter rudis* sp. nov. (Vaz-Moreira et coll. 2011) ; *Acinetobacter kyonggiensis* sp. nov. (Lee et coll. 2010) ; *Acinetobacter brisouii* sp. nov. (Anandham et coll. 2010) ; *Acinetobacter venetianus* sp. nov. (Vanechoutte et coll. 2009) ; *Acinetobacter antiviralis* sp. nov. (Lee et coll. 2009) ; *Acinetobacter soli* sp. nov. (Kim et coll. 2008) ; *Acinetobacter marinus* sp. nov. et *Acinetobacter seohaensis* sp. nov. (Yoon et coll. 2007). ^bNoms proposés par Nemec et coll. 2011 et 2010.

4. Pouvoir pathogène et virulence.

Par le passé, le genre *Acinetobacter* était considéré comme faiblement pathogène. Mais la description de pneumonies communautaires graves à *Acinetobacter* indique que ces bactéries peuvent avoir un pouvoir pathogène important (Joly-Guillou. 2005). Il convient de noter que les études portant sur la virulence de *Acinetobacter* sont encore peu nombreuses, notamment en comparaison avec les études portant sur l'épidémiologie et la résistance aux antibiotiques.

✓ Le lipopolysaccharide produit par *Acinetobacter* présente une toxicité létale chez la souris et cette endotoxine est détectée lors de bactériémies à *Acinetobacter*. Il altère aussi l'action bactéricide du complément dans le sérum humain en agissant de façon synergique avec la capsule polysaccharidique ((Joly-Guillou. 2005).

✓ La production d'exopolysaccharides, décrite pour 30% des souches de *Acinetobacter* (Obana. 1986), protège les bactéries vis-à-vis des défenses de l'hôte.

✓ Le quorum-sensing est un mécanisme de régulation largement présent chez les bactéries à Gram négatif et quatre systèmes de quorum-sensing ont été décrits chez *Acinetobacter*. Ces systèmes semblent jouer un rôle d'auto-induction de facteurs de virulence multiples.

✓ *Acinetobacter* spp. présente une surface cellulaire de caractère hydrophobe, une caractéristique favorisant son adhérence sur des polymères (cathéters, sondes).

✓ Le contact entre la bactérie et les cellules de l'hôte implique des adhésines, des fimbriae ou des polysaccharides (Bergogne-Bérézin et coll. 2008).

✓ La production de vérotoxine est associée à des diarrhées sanglantes et a été mise en évidence chez *A. haemolyticus* (Grotiuz et coll. 2006).

✓ Les sidérophores sont des protéines permettant la captation du fer de l'hôte au profit de la bactérie, or la diminution de la concentration en fer extracellulaire est un mécanisme de défense possible contre les infections (Doughari et coll. 2011).

✓ OmpA est une protéine de membrane externe dont la séquence est très conservée entre *A. radioresistens*, *A. baumannii* et *A. junii* et capable d'induire l'apoptose de cellules épithéliales de l'hôte (Choi et coll. 2005).

✓ L'activité enzymatique de certaines enzymes comme les estérases, les aminopeptidases, les uréases et les phosphatases acides, pourraient aussi jouer un rôle dans la virulence chez *Acinetobacter* spp. (Bergogne-Bérézin et coll. 2008).

✓ Une étude récente a montré la capacité de *Acinetobacter* spp. à former un biofilm, une structure constituée de cellules bactériennes entourées de polysaccharides. Cette structure

permet un échange de matériel génétique entre les bactéries et assure leur survie, notamment dans l'environnement hospitalier. De manière intéressante dans cette étude, il a été noté que ce sont les espèces les plus fréquemment impliquées dans des pathologies cliniques (notamment celles du complexe *A. baumannii*-*A. calcoaceticus*) qui ont la plus grande capacité de former un biofilm, par rapport à d'autres espèces (*A. johnsonii*, *A. lwoffii* et *A. radioresistens*) (Marti et coll. 2011).

5. Impact clinique de *Acinetobacter* spp.

L'espèce la plus fréquemment impliquée en pathologie humaine est de loin *A. baumannii*. Toutefois, il convient de noter que les études rapportant des infections à *Acinetobacter* utilisent des méthodes pour le diagnostic d'espèce dont la précision est variable et conduisent à interpréter avec prudence cette donnée.

5.1. Impact clinique de *A. baumannii*

✓ Infections communautaires

Les infections dues à *A. baumannii* sont le plus souvent nosocomiales, rarement communautaires. Celles-ci sont le plus souvent des pneumonies survenant en zone tropicale (Asie et Australie) (Peleg et coll. 2008), à la saison des pluies et chez des patients présentant un éthylisme chronique.

Récemment, un cas de méningite communautaire à *A. baumannii* a été rapporté en Afrique du Sud (Lowman et coll. 2008).

✓ Infections nosocomiales

Les principales infections nosocomiales sévères dues à *A. baumannii* sont les pneumopathies, les bactériémies, les infections de la peau et des tissus mous et les méningites secondaires, plus rarement des infections de l'appareil urinaire (Peleg et coll. 2008).

Aux Etats-Unis, entre 5 et 10% des pneumonies nosocomiales sont dues à *A. baumannii* (Gaynes et coll. 2005).

En France en 2006, *A. baumannii* représentait 0,9% des micro-organismes isolés des bactériémies nosocomiales (Réseau bactériémie CLIN, Paris-Nord, France). La majorité des souches de *A. baumannii* sont isolées en service de réanimation. Dans une large étude aux Etats-Unis (1995-2002), *A. baumannii* était responsable de 1,3% des bactériémies. Le taux de

mortalité, suite à ces bactériémies, varie de 34 à 43% en unité de réanimation et 16% dans les autres services (Wisplinghoff et coll. 2004).

A. baumannii peut également provoquer des infections de la peau et des tissus mous, notamment au niveau des plaies chez les blessés de guerre (Johnson et coll. 2007) et les grands brûlés (Trottier et coll. 2007).

Les cas de méningites à *A. baumannii* surviennent, pratiquement exclusivement, sous une forme secondaire après un traumatisme crânio-cérébral ou après intervention neurochirurgicale (Metan et coll. 2007). L'infection est souvent associée à la présence de shunts ventriculaires et notamment de dérivation externe du liquide céphalo-rachidien.

Quelques cas cliniques rapportent des endocardites, des endophtalmies ou des kératites (Menon et coll. 2006 ; Corrigan et coll. 2001) et *A. baumannii* est occasionnellement responsable d'infections urinaires (Gaynes et coll. 2005).

✓ **Épidémiologie hospitalière**

Si *A. baumannii* n'est pas le germe le plus fréquemment responsable d'infections nosocomiales, deux caractéristiques de ces infections les rendent redoutables :

- Leur survenue par épidémies. Ces épidémies conduisent parfois à la fermeture temporaire de certains services, avec un coût important (Garlantezec et coll. 2011)
- Les souches impliquées sont souvent multi-résistantes aux antibiotiques.

Le premier réservoir de *A. baumannii* à l'hôpital est le patient infecté et/ou colonisé et sa présence dans l'environnement est secondaire. La transmission manuportée a une importance majeure dans la dissémination des infections nosocomiales (Dijkshoorn et coll. 2007).

En Europe, depuis les années 1980, les épidémies hospitalières à *A. baumannii* ont été caractérisées grâce à des techniques moléculaires et épidémiologiques (Peleg et coll. 2008). Dans la majorité des cas, une ou deux souches épidémiques sont mises en cause. La transmission de ces souches a parfois été observée entre différents hôpitaux, suite au transfert de patients colonisés ou infectés (Naas et coll. 2007). Ce fut le cas en France avec une épidémie de *A. baumannii* producteur de la BLSE VEB-1 qui a affecté 55 hôpitaux à travers la France (Naas et coll. 2006).

5.2. Impact clinique des espèces de *Acinetobacter non-baumannii*

De nombreuses études supportent le fait que les espèces proches de *A. baumannii*, i.e. *Acinetobacter genomic species 3* et *Acinetobacter genomic species 13* TU jouent un rôle important en pathologie humaine, notamment par le biais d'épidémies (Espinal et coll. 2011). Dans une large étude sur 584 isolats de *Acinetobacter* (Seifert et coll. 1993), plus de 70% des souches étaient classées en *A. baumannii*. Les autres espèces identifiées étaient *Acinetobacter genomic species 3* (9.4%), *A. johnsonii* (4.9%) et *A. lwoffii* (3.6%). Dans une autre étude réalisée au Royaume-Uni et en Eire sur 690 souches, 78% des souches étaient des *A. baumannii*, 8.8% *A. lwoffii* (essentiellement des bactériémies), 4% *A. ursingii* et 1.7% *Acinetobacter genomic species 3* et *A. johnsonii* (Turton et coll. 2010). Quelques études ont rapporté des prévalences plus élevées d'infections causées par *Acinetobacter genomic species 3* (26% et 39 %) (Bou et coll. 2009 ; van den Broek et coll. 2009).

Une étude récente a décrit les principales différences entre les infections et colonisations à *Acinetobacter genomic species 3* et celles à *A. baumannii*. *Acinetobacter genomic species 3* était plus souvent identifié chez des patients hospitalisés hors réanimation (69% des cas) ou en ambulatoire (23%), et à partir de prélèvements d'abcès ou d'écouvillons de plaies situés au niveau de la peau et des tissus mous. *A. baumannii* était de manière statistiquement significative plus souvent isolé chez des patients de réanimation (50% vs 15.4%), avec une acquisition nosocomiale (97.2% vs 76.9%) et avec une administration préalable d'antibiotiques plus fréquente.

Alors que la prévalence de *Acinetobacter genomic species 13* TU semble faible, une étude présentée lors d'un récent symposium sur *Acinetobacter* et caractérisant 120 souches consécutives isolées à partir d'hémocultures

A. lwoffii a été impliqué dans des infections communautaires ou nosocomiales de type endocardites, endophtalmies, méningites, gastrites, bactériémies secondaires à des infections de cathéter ou secondaires à des gastroentérites aiguës (Crawford et coll. 1997 ; Serrano et coll. 1993 ; Valero et coll. 1999).

A. haemolyticus a été décrit comme agent responsable d'endocardite et de diarrhée sanglante avec production de Shiga toxine (Castellanos Martinez et coll. 1995; Grotiuz et coll. 2006).

A. johnsonii a été associé à des bactériémies secondaires à des infections de cathéter (Seifert et coll. 1993).

A. radioresistens a un rôle pathogène décrit uniquement en cas d'immunodépression avec un cas clinique rapporté de bactériémie chez une patiente infectée par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Visca et coll. 2001).

A. junii a été décrit comme responsable de bactériémies et de sepsis en réanimation néonatale et en oncologie pédiatrique (de Beaufort et coll. 1999 ; Bernards et coll. 1997 ; Kappstein et coll. 2000).

A. ursingii a été rapporté plusieurs fois comme agent responsable de bactériémies, en obstétrique et en néonatalogie (Mader et coll. 2010 ; Horii et coll. 2011).

A. calcoaceticus fait partie du complexe *A. baumannii*-*A. calcoaceticus* et est généralement considéré plutôt comme un germe de l'environnement. Son caractère proche de *A. baumannii* peut sans doute être à l'origine d'une sous-estimation de son implication clinique.

6. Sensibilité aux β -lactamines et mécanismes de résistance chez *A. baumannii*

Du fait de son implication clinique largement dominante par rapport aux autres espèces de *Acinetobacter*, la résistance aux antibiotiques de *A. baumannii* est la plus étudiée, même si de plus en plus d'intérêt est porté sur la résistance aux antibiotiques des autres *Acinetobacter* spp (Espinal et coll. 2011).

6.1. Phénotype sauvage de *A. baumannii*

Les souches de *A. baumannii* sont naturellement résistantes à la pénicilline G, à l'amoxicilline et aux céphalosporines de première et deuxième générations.

Les souches sauvages de *A. baumannii* produisent une β -lactamase de type céphalosporinase (ou AmpC), désignée également « *Acinetobacter*-**derived** cephalosporinases » (ADCs). La présence de ces enzymes ADCs représente le mécanisme de résistance aux β -lactamines le plus fréquent chez *A. baumannii*. Cette enzyme est capable d'hydrolyser les aminopénicillines et les céphalosporines de première et de deuxième générations (Bou et Martinez-Beltran. 2000). Contrairement aux enzymes AmpC identifiées chez les autres organismes à Gram négatif, l'expression du gène *bla*_{ampC} n'est pas inductible. Ceci est dû au fait qu'aucun gène régulateur n'est présent en amont du gène *bla*_{ampC}, contrairement à ce que l'on observe par exemple pour *P. aeruginosa*.

A. baumannii possède aussi naturellement sur son chromosome un gène codant pour une oxacillinase (ou β -lactamase de classe D) dont le représentant principal est OXA-51, avec de très nombreux variants décrits comme OXA-69, OXA-66 par exemple. Le rôle des gènes de type *bla*_{OXA-51} dans la résistance naturelle de *A. baumannii* semble très faible (Héritier et coll. 2005a). La résistance naturelle de *A. baumannii* à certaines β -lactamines résulte de l'association de plusieurs mécanismes incluant une taille réduite des protéines de membrane externe et une production limitée de porines.

L'utilisation non contrôlée d'antibiotiques à large spectre a contribué à la sélection et à l'émergence de souches multi-résistantes, voire pan-résistantes. Cette résistance aux antibiotiques pose de nombreuses difficultés thérapeutiques.

6.2. Supports génétiques de la résistance aux β -lactamines chez *A. baumannii*

Les gènes de résistance aux antibiotiques peuvent faire partie du patrimoine génétique intrinsèque à la bactérie (support chromosomique) ou appartenir à un élément génétique mobile : plasmide, transposon, ou gène cassette (intégron).

Les gènes de résistance dont le support génétique est chromosomique sont généralement stables et transmis à la descendance de la bactérie (transmission verticale). Ceux dont le support génétique est un élément mobile sont transmis à la descendance de la bactérie mais sont souvent instables en l'absence d'une pression de sélection par l'antibiotique concerné par la résistance. En revanche, ce type de mécanisme a souvent la faculté d'être transférable d'une bactérie à une autre (pouvant appartenir à des espèces ou des genres très différents, transmission horizontale), entraînant une diffusion importante de la résistance dans le monde bactérien, voire des épidémies.

Plus de 80% des isolats de *Acinetobacter* spp. portent des plasmides de tailles variables (Bergogne-Bérézin et coll. 1996). Les gènes portés par les plasmides sont principalement des gènes de β -lactamases des classes A, B et D de Ambler, mais également des gènes de résistance aux aminosides, ou encore des gènes de résistance au triméthoprim.

La transposition est l'intégration directe d'une séquence de gène au sein d'un génome (chromosomique ou plasmidique), en l'absence d'homologie de séquences nucléotidiques. Les déterminants génétiques transposables chez *A. baumannii* peuvent être des gènes de résistance aux β -lactamines, aux aminosides, à la tétracycline et au chloramphénicol.

L'un des mécanismes qui favorise le plus la multi-résistance chez *A. baumannii* est la capture et l'expression des gènes de résistance sous forme de cassettes au sein des intégrons. Cette structure génétique d'intégron favorise la co-sélection et la co-expression des gènes de résistance. Ainsi, au sein d'un intégron peuvent être associés des gènes différents de β -lactamases, des gènes de résistance aux aminosides, à la rifampicine et au chloramphénicol (Poirel et coll. 2003). Il existe plusieurs classes d'intégrons définies en fonction de la nature des gènes codant pour une intégrase, mais les intégrons de classe 1 sont les plus fréquents chez *A. baumannii*. Des intégrons de classe 2 ont également été décrits chez *A. baumannii*.

6.3. Résistances acquises aux β -lactamines chez *A. baumannii*

La résistance acquise aux pénicillines (notamment la ticarcilline) a été décrite dès le début des années 1980 avec l'identification de la pénicillinase TEM-1 (Goldstein et coll. 1983) puis du variant TEM-2 (Devaud et coll. 1982). C'est ensuite la pénicillinase CARB-5 qui a été rapportée chez *A. baumannii* et SCO-1 (Poirel et coll. 2007a). La localisation plasmidique du gène codant cette enzyme a permis sa dissémination dans d'autres espèces de *Acinetobacter* en Argentine et dans des souches de *E. coli* isolées en Grèce (Papagiannitsis et coll. 2007).

La résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération (notamment la ceftazidime) peut être liée à plusieurs mécanismes :

✓ L'insertion de la séquence d'insertion IS*Aba1* immédiatement en amont du codon d'initiation du gène *bla_{ampC}* a été démontrée comme étant responsable de l'apport de séquences promotrices entraînant une surexpression de ce gène (Héritier et coll. 2006). Ceci représente le mécanisme de résistance le plus fréquent chez *A. baumannii*.

✓ Plus rarement : acquisition d'une β -lactamase à spectre élargi (BLSE). Les plus classiques sont VEB-1 (Poirel et coll. 2003) et PER-1 (Vahaboglu et coll. 1997), mais d'autres BLSE plus rares ont été décrites comme SHV-12 (Huang et coll. 2004), SHV-5 (Naas et coll. 2007b), TEM-92 (Endimiani et coll. 2007) ou CTX-M-2 (Nagano et coll. 2004). Les BLSE de type GES ont aussi été décrites chez *A. baumannii*, certains variants comme GES-11 et surtout GES-14 pouvant conférer une résistance à toutes les β -lactamines, incluant les carbapénèmes (Bonnin et coll. 2011 ; Moubareck et coll. 2009). Plus récemment, la BLSE la plus répandue dans le monde, CTX-M-15, a été identifiée chez *A. baumannii* (Poirel et coll. ICAAC 2011 ; Shakil et coll. 2010).

6.4. Résistances acquises aux carbapénèmes chez *A. baumannii*

La **résistance aux carbapénèmes** est problématique chez *A. baumannii* puisque ces molécules sont considérées comme le traitement de choix des infections impliquant ce germe. Lorsque ce germe est résistant aux carbapénèmes, les possibilités thérapeutiques deviennent très limitées. Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine de la résistance aux carbapénèmes chez *A. baumannii*.

6.4.1. Mécanismes enzymatiques

Ce sont les mécanismes les plus fréquents de résistance aux carbapénèmes chez *A. baumannii* (Poirel et coll. 2006). Ils sont liés le plus souvent à l'acquisition d'enzymes à propriétés de carbapénémases détaillées plus haut :

- ✓ **oxacillinases à propriétés de carbapénémase (CHDLs)** telles que OXA-23, OXA-24/40, OXA-58 ou OXA-143.
- ✓ **métallo- β -lactamases (MBLs)** de type IMP, VIM, SIM ou NDM.
- ✓ **carbapénémases appartenant au groupe A de Ambler** comme KPC ou certains variants de GES comme GES-14.

Certains auteurs ont évoqué la possibilité d'une surexpression de l'oxacillinase naturelle de *A. baumannii* (OXA-51 et ses variants) par insertion de *ISAbal* en amont du gène codant pour cette β -lactamase (Turton et coll. 2006). Cependant, la réelle contribution de la structure *ISAbal*-gène de type *bla*_{OXA-51} à la résistance aux carbapénèmes chez *A. baumannii* fait débat puisque cette structure a été identifiée dans des souches de *A. baumannii* résistantes et sensibles aux carbapénèmes.

6.4.2. Mécanismes non-enzymatiques

Les mécanismes de résistance aux carbapénèmes chez *A. baumannii* sont moins fréquents que les mécanismes enzymatiques mais font l'objet d'un nombre croissant de publications. De plus, les mécanismes enzymatiques et non-enzymatiques peuvent être associés dans une même souche de *A. baumannii*.

- ✓ **Diminution de la perméabilité membranaire.**

Des modifications de la perméabilité membranaire de *A. baumannii* peuvent entraîner une résistance aux carbapénèmes. Ainsi, la perte de la protéine de membrane externe CarO, secondaire à l'interruption du gène *carO* par différentes séquences d'insertion (notamment IS*Aba825*) peut être à l'origine d'une résistance aux carbapénèmes (Mussi et coll. 2005). Un site spécifique de liaison à l'imipénème a récemment été mis en évidence pour la première fois au sein de CarO. De manière inattendue, aucun site de liaison au méropénème n'a été identifié dans cette porine, faisant évoquer la possibilité de l'implication d'une autre protéine de membrane (Catel-Ferreira et coll. 2011). Une étude récente rapporte une grande diversité des séquences de *carO* au sein d'une population de *A. baumannii* isolés en Argentine en rapport avec un transfert horizontal de gène (Mussi et coll. 2011). Cet échange de variants de *carO* pourrait représenter une stratégie au sein de la population de *A. baumannii* étudiée afin de survivre dans différentes conditions environnementales.

✓ **Efflux.**

L'implication de systèmes d'efflux naturels ou acquis dans la multirésistance aux antibiotiques chez *A. baumannii* est de plus en plus étudiée (Coyne et al AAC 2011). Parmi les superfamilles de pompes d'efflux, les systèmes RND (Resistance-Nodulation-Division) sont les plus prévalents chez *A. baumannii* (Coyne et coll. 2010 ; Damier-Polle et coll. 2008 ; Marchand et coll. 2004 ; Magnet et coll. 2001). Les pompes RND comme AdeABC ou AdeIJK présentent typiquement un large spectre de substrats incluant des antibiotiques, des antiseptiques ou des détergents. La surexpression de AdeABC est associée à une augmentation du niveau de résistance à l'imipénème et au méropénème, surtout lorsqu'elle est associée à l'expression d'enzymes de type CHDL (Héritier et coll. 2005). La pompe AdeIJK est capable d'effluer les β -lactamines, le chloramphénicol, les tétracyclines, l'érythromycine, les lincosamides, les fluoroquinolones, l'acide fusidique, la rifampicine, la novobiocine et le triméthoprime (Damier-Polle et coll. 2008).

✓ **Modification de PLPs.**

Une modification des PLPs à l'origine de la résistance aux carbapénèmes chez *A. baumannii* n'a été que très rarement investiguée mais il semble que la régulation de l'expression des PLPs puisse être associée à une diminution de sensibilité aux carbapénèmes (Fernandez-Cuenca et coll. 2003).

7. Sensibilité aux β -lactamines et mécanismes de résistance chez *Acinetobacter* spp. non-*baumannii*

De façon générale, les espèces bactériennes *Acinetobacter* spp. non-*baumannii* ont une plus grande sensibilité aux antibiotiques que *A. baumannii*.

Acinetobacter genomic species 3 semble être l'espèce présentant le plus de résistance aux antibiotiques puisque seulement 18% des souches étaient sensibles à l'ampicilline et aucune sensible à la cefazoline, ceftioxime et au cefturoxime dans une étude de 1993 (Seifert et coll. 1993).

✓ **Les céphalosporinases de type ADCs** ont été décrites chez *Acinetobacter* genomic species 3 et *Acinetobacter* genomic species 13 TU (Espinal et coll. 2011). Comme chez *A. baumannii*, la présence de IS*Aba1* a été mise en évidence en amont de *bla*_{ADC} chez *Acinetobacter* genomic species 3 et associée à la résistance aux céphalosporines (Lin et coll. 2010).

✓ **Des β -lactamases du groupe A de Ambler** ont aussi été décrites : pénicillinase à spectre étroit de type SCO-1 (Poirel et coll. 2007), enzymes de type BLSE (PER-1 notamment chez *Acinetobacter* genomic species 3, Yong et coll. 2003), et même BLSE à activité de carbapénémase comme KPC-10 identifiée à Porto Rico dans des souches appartenant au complexe *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* (Robledo et coll. 2010).

✓ **Les Mérallo- β -lactamases** IMP-1, VIM-2, SIM-1 chez *Acinetobacter* genomic species 3, *Acinetobacter* genomic species 10, 13 TU et 14 (Kim et coll. 2010). IMP-4 a été identifié chez *A. johnsonii* aux Philippines.

✓ Comme chez *A. baumannii*, **les oxacillinases à activité de carbapénémase (CHDLs)** ont été rapportées.

OXA-23 a été identifiée dans des souches de *Acinetobacter* genomic species 3 et de *A. johnsonii*.

OXA-58 a ainsi été décrite chez *A. junii* en Roumanie, *Acinetobacter* genomic species 3 en Italie, *Acinetobacter* phenon 6/ct 13TU en Espagne (Kim et coll. 2010), *Acinetobacter* genomic species 14TU et *A. radioresistens* en Inde (Mendes et coll. 2009).

Tableau 3. Principales β -lactamases décrites chez *Acinetobacter* spp. non-*baumannii*.

<i>Acinetobacter</i> spp.	Classes de β -lactamases selon Ambler			
	Classe A	Classe B	Classe C	Classe D
<i>A. calcoaceticus</i> - <i>A. baumannii</i>	SCO-1, KPC-10			
<i>A. calcoaceticus</i>			AmpC	OXA-24, OXA-58
<i>Acinetobacter</i> genomic species 13TU	PER-1, TEM-1	IMP-1, IMP-4, VIM-2, VIM-11	IS <i>AbaI</i> - <i>bla</i> _{ADC}	OXA-58, OXA-23
<i>Acinetobacter</i> genomic species 3	PER-1, TEM-1	IMP-1, IMP-4, VIM-2, SIM-1	IS <i>AbaI</i> - <i>bla</i> _{ADC}	OXA-58, OXA-23, OXA-66
<i>A. junii</i>				OXA-58
<i>A. johnsonii</i>		IMP-4		OXA-23
<i>A. radioresistens</i>				OXA-58
<i>Acinetobacter</i> genomic species 10		IMP-1, VIM-2, SIM-1		
<i>Acinetobacter</i> genomic species 14TU		IMP-1, VIM-2, SIM-1		OXA-58

8. Résistance aux aminosides chez *Acinetobacter* spp.

Depuis 1995, 80% des souches de *A. baumannii* isolées en France, en Europe ainsi qu'aux Etats-Unis sont résistantes à au moins un des quatre principaux aminosides utilisés en pratique médicale (gentamicine, tobramycine, amikacine, netilmicine) (Bouvet et coll. 2000). La résistance aux aminosides est essentiellement due à l'acquisition de plasmides, d'intégrons ou de transposons responsables de la production d'enzymes modificatrices. Les trois types d'enzymes inactivant les aminosides ont été décrits chez *A. baumannii* : aminoside acétyltransférase AAC, aminoside nucléotidyl-transférase ANT, aminoside phosphotransférase APH. En Europe, 84% des isolats de *A. baumannii* expriment au moins deux enzymes d'inactivation des aminosides (Nemec et coll. 2004).

Les enzymes les plus fréquemment rencontrées chez *A. baumannii* sont AAC(3)-I et ANT(3'')-I ou encore AAC(3)-II, AAC(6')-I, ANT(2''), APH(3')-I et APH(3')-VI (Seward et coll. 1998). Les gènes codant pour des enzymes inactivant les aminosides sont sous forme de gènes cassettes au sein des intégrons chez *Acinetobacter* spp. Récemment, la méthylation de l'ARNr 16S par la protéine codée par le gène *armA* a été décrite au Japon, en Corée de Sud et aux Etats-Unis (Peleg et coll. 2008). Ce gène plasmidique est associé au transposon Tn1548 (Doi et coll. 2007). Les principales enzymes d'inactivation des aminosides sont résumées dans le tableau 3.

Tableau 4. Enzymes d'inactivation des aminosides les plus communes chez *A. baumannii* et substrats préférentiels.

Enzymes	Noms	Substrats préférentiels
Acétylases	AAC(3)-I	Gentamicine
	AAC(3)-II	Gentamicine, Tobramycine, Netilmicine
	AAC(6')-I	Tobramycine, Netilmicine, Amikacine
	AAC(6')-II	Gentamicine, Tobramycine, Netilmicine
Adénylases	ANT(2'')-I	Gentamicine, Tobramycine
	ANT(3'')(9)	Streptomycine, Spectinomycine
Phosphorylases	APH(3')-I	Kanamycine, Néomycine
	APH(3')-VI	Kanamycine, Néomycine, Amikacine, Isépamicine
Méthylases	ArmA	Gentamicine, Tobramycine, Amikacine

La résistance aux aminosides a également été associée à l'expression du système d'efflux de type RND (Resistance Nodulation-cell Division) AdeABC par *A. baumannii* (Magnet et coll. 2001). La gentamicine et la kanamycine sont également des substrats de la pompe AbeM, membre de la famille des transporteurs MATE (Multidrug and toxic compound extrusion) (Su et coll. 2005).

9. Résistance aux quinolones

Acinetobacter spp. est naturellement résistant à l'acide pipémidique, mais était sensible à l'acide nalidixique jusque dans les années 1970. La résistance aux fluoroquinolones est apparue très rapidement après l'introduction de ces molécules en thérapeutique.

Les mécanismes de résistances décrits sont liés à des mutations dans la cible des quinolones que sont les topoisomérases de type II (ADN gyrase et topoisomérase IV) et notamment au sein de courtes régions répétées (Quinolone Resistant Determinant Region). Ces mutations se situent au niveau des gènes codant pour une sous-unité de l'ADN gyrase (Vila et coll. 1995), ou pour une sous-unité de la topoisomérase IV, ParC (Vila et coll. 1997b). Les mutations dans le gène *parC* interviennent dans des souches où *gyrA* est déjà muté entraînant des niveaux de résistance très élevés à la ciprofloxacine. Les systèmes d'efflux de type RND AdeABC, AdeIJK et la pompe AdeM de type MATE contribuent également à la résistance aux fluoroquinolones (Magnet et coll. 2001; Damier-Piolle et coll. 2008 ; Su et coll. 2005).

10. Résistance aux autres antibiotiques

Acinetobacter est naturellement résistant à bas niveau au triméthoprim (CMI = 16-32 mg/L) (Bouvet et coll. 2000). La résistance à haut niveau est due à l'acquisition d'un gène de résistance, *dhfrI*, porté par un plasmide qui porte également des gènes de résistance à l'ampicilline, au chloramphénicol, à la kanamycine, à la streptomycine et au sulfaméthoxazole (Goldstein et coll. 1984). La résistance au triméthoprim est également associée à l'expression des systèmes d'efflux de type RND AdeABC et AdeIJK par *A. baumannii* (Magnet et coll. 2001; Damier-Piolle et coll. 2008).

Le gène *cat*, codant pour l'acétyltransférase I inactivant le chloramphénicol, est porté par un transposon se comportant en réplicon. Le gène est flanqué de répétitions de la séquence d'insertion *ISI* facilitant son amplification, donc l'expression phénotypique de la résistance et la dissémination du gène de résistance (Elisha et coll. 1991). Le chloramphénicol est également un substrat des systèmes d'efflux de type RND AdeABC et AdeIJK (Magnet et coll. 2001; Damier-Piolle et coll. 2008).

Les souches de *Acinetobacter* résistantes à la tétracycline expriment, en général, un des deux mécanismes de résistance suivant : un système d'efflux ou un système de protection ribosomique. Comme la plupart des gènes de résistance à la tétracycline a été rencontrée sur des plasmides ou des transposons, l'acquisition de résistance est, en général, médiée par transfert de gènes (Roberts. 1996). Les gènes codant pour TetA et TetB, intervenant chacun dans un système d'efflux des tétracyclines énergie dépendant, ont été rencontrés dans des isolats cliniques et aquatiques de *A. baumannii* (Guardabassi et coll. 2000). Le gène *tetM* codant pour une protéine de protection ribosomique a été rencontré dans un isolat clinique de *A. baumannii* (Ribera et coll. 2003). La résistance intrinsèque à la tétracycline a été également

associée à l'expression des systèmes d'efflux de type RND AdeABC et AdeIJK (Magnet et coll. 2001; Damier-Piolle et coll. 2008). La tétracycline est également un substrat des systèmes d'efflux de type RND AdeABC et AdeIJK (Magnet et coll. 2001; Damier-Piolle et coll. 2008).

La rifampicine possède une activité intéressante sur *Acinetobacter*, mais les risques de mutations vers la résistance sont élevés. Le gène de résistance *arr-2* codant pour la rifampicine ADP-ribosyltransférase a cependant été identifié sous forme de cassette au sein d'intégrons de classe I (Vallenet et coll. 2008). La rifampicine est également un substrat du système d'efflux de type RND AdeIJK (Damier-Piolle et coll. 2008).

La colistine, de la classe des polymyxines, exerce un effet bactéricide par altération de la membrane cytoplasmique de la bactérie. Cet antibiotique, bien que responsable d'effets indésirables, présente un regain d'intérêt en thérapeutique suite à l'émergence de bactéries pathogènes résistantes aux traitements habituels. La résistance à la colistine reste rare parmi ces bactéries, cependant un système de régulation à deux composantes PmrAB est impliqué dans la résistance à la colistine chez *A. baumannii* (Adams et coll. 2009).

Chapitre D: Les éléments génétiques mobiles

1. Les séquences d'insertion

1.1. Organisation

Les séquences d'insertion (IS) sont des éléments génétiques mobiles d'une taille en général inférieure à 2500 paires de base (pb) et dont la séquence code habituellement pour une transposase permettant leur excision-insertion. Elles sont présentes dans la majorité des génomes analysés et représentent 2 à 5 % de l'ADN génomique total. Ces éléments mobiles sont des fragments d'ADN qui sont insérés dans le génome d'un organisme hôte et qui ont la propriété de se déplacer d'un point à un autre du génome (Chandler et coll. 2002).

1.1.1. Les séquences inversées répétées (IR)

Les IS sont délimitées de part et d'autre de deux séquences inversées répétées (IR pour Inverted Repeat) plus ou moins parfaites de 10 à 40 pb. Elles sont indispensables pour la transposition. Les IRs comprennent deux domaines fonctionnels. Le premier, correspondant aux 2-3 dernières paires de bases de l'IR, est impliqué dans le clivage et la réaction de transfert de brins conduisant à la transposition de l'élément, et le second est impliqué dans la fixation de la transposase (Figure 9). Les IRs sont reconnues par la transposase et sont associées lors des événements de transposition (Chandler et coll. 2002).

1.1.2. Les transposases

La transposase est indispensable à la mobilisation de la séquence d'insertion. Elle est codée par une ou deux phases ouvertes de lecture occupant la quasi-totalité de la séquence de l'IS. Elle présente deux domaines fonctionnels, le premier jouant un rôle dans la liaison avec l'ADN et se situe dans le domaine N-terminal de la protéine et le deuxième ayant une activité catalytique et se situant dans le domaine C-terminal de la protéine. Sa séquence protéique présente une triade d'acides aminés acides qui est impliquée dans la réaction catalytique ; son rôle est lié à la coordination d'ions bivalents (en particulier Mg^{2+}) impliqués dans de nombreuses réactions d'attaques nucléophiles qui interviennent lors de la transposition. Cette

triade, connue sous le nom de motif DDE, est fortement conservée au sein des séquences de nombreuses IS (Chandler et coll. 2002).

1.1.3. Les séquences en répétition directe (DR)

Lors de leur insertion, de nombreuses ISs engendrent une duplication du site d'insertion de part et d'autre de leur séquence, entraînant ainsi la formation de deux petites séquences en répétition directe (DR « Direct Repeat ») de 2 à 15 pb situées de part et d'autre de l'IS. Cette duplication d'une séquence de l'ADN hôte est le témoin indirect d'un évènement de transposition (Figure 9).

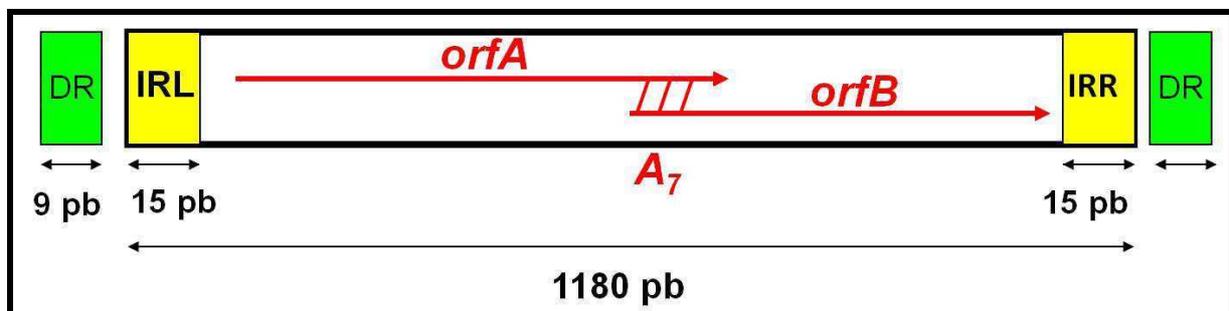


Figure 9. Organisation d'une séquence d'insertion : exemple de ISAbal. La boîte blanche représente ISAbal, les boîtes jaunes schématisent ses IRs de 15 pb, les boîtes vertes correspondent aux DRs de 9 pb. La transposase est représentée par deux orfs chevauchants A et B. La zone hachurée correspond au motif heptamérique d'adénines A₇.

1.2. Régulation de l'activité de transposition

L'activité de transposition est généralement maintenue à un faible niveau. En effet, une forte activité de transposition entraînerait des réarrangements génétiques importants potentiellement létaux pour la bactérie hôte. Différents mécanismes de régulation ont été décrits. ISAbal, qui a été identifiée dans l'environnement génétique du gène bla_{OXA-23} chez *A. baumannii*, présente un mécanisme de régulation par décalage du cadre de lecture (Mugnier et coll. 2009). Ce mécanisme agit au niveau de l'élongation de la traduction et implique un décalage du cadre de lecture entre les deux phases ouvertes de lecture consécutives [ex : IS1 (Escoubas et coll. 1991)]. Le plus souvent, le décalage se produit par glissement du ribosome d'une base en amont, généralement au niveau d'heptanucléotides (ex : AAAAAAG). Le décalage du cadre de lecture est favorisé par la présence de structures secondaires au niveau

de l'ARNm gênant la progression du ribosome. Dans ce cas, la première phase ouverte de lecture contient le domaine de fixation à l'ADN, tandis que l'autre contient le domaine catalytique. Le produit obtenu à partir de la première phase de lecture peut jouer le rôle de modulateur en se fixant au niveau des IRs et le décalage du cadre de lecture permet de relier les deux domaines en une seule protéine fonctionnelle. Ainsi, la fréquence du décalage du cadre de lecture a une influence directe sur l'activité de transposition (Chandler et coll. 2002)

1.3. Les séquences d'insertion associées au gène *bla*_{OXA-23}

1.3.1. *ISAbal*

ISAbal fait partie de la famille IS4 qui regroupe des séquences d'insertion extrêmement hétérogènes. Cependant, les membres de cette famille se classent en sous-groupes assez homogènes. Beaucoup d'entre elles ont la capacité de former des transposons composites. L'alignement de la séquence protéique de la transposase montre plusieurs régions conservées et, en particulier, le motif DDE. Les membres de cette famille transposent de manière répllicative ou par « couper-coller » (Nagai et coll. 2000 ; Chandler et coll. 2002).

La séquence de *ISAbal* fait 1180 pb avec un pourcentage en GC de 35. *ISAbal* se compose de deux IRs de 15 pb. On observe dans les quelques cas décrits que *ISAbal* est flanquée de régions en répétitions directes de 9 pb. On observe également au sein de *ISAbal* deux phases ouvertes de lecture qui pourraient coder pour la transposase dans le cas où se produirait un décalage du cadre de lecture. Les deux *orfs* se chevauchent au niveau d'une séquence heptanucléotidique d'adénines nommée motif A₇.

Des études préliminaires montrent que *ISAbal* n'est pas systématiquement présente chez *A. baumannii* et que le nombre de copies de cette IS est variable au sein d'un génome. *ISAbal* a également été identifiée dans deux isolats cliniques de *A. lwoffii*, mais elle n'est pas associée aux gènes de résistance aux antibiotiques ; aucune copie n'a été identifiée chez *A. calcoaceticus*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *E. cloacae* et *P. aeruginosa* (Segal et coll. 2005).

ISAbal a été identifiée, jusqu'alors, dans trois configurations génétiques particulières liées à la résistance aux antibiotiques.

✓ **Interruption de gène** : l'inactivation par insertion d'une copie de l'élément *ISAbal* dans le gène codant pour la porine CarO confère une diminution de sensibilité aux carbapénèmes chez *A. baumannii* (Elisha et coll. 2006).

✓ **Apport de promoteur putatif** : *ISAbal* s'insère en orientation opposée au gène *bla_{ampC}* codant pour la céphalosporinase chromosomique, 9 pb en amont de son codon d'initiation. Ceci entraîne l'acquisition d'un promoteur fort proche de sa séquence codante et l'éloignement de son promoteur naturel. *ISAbal* apporte un nouveau promoteur au gène *bla_{ampC}* qui se compose des motifs -35 et -10 et dont la séquence est extrêmement proche de la séquence consensus du promoteur des bacilles à Gram négatif reconnu par le facteur de transcription σ 70. De plus, la séquence apporte un site de liaison du ribosome permettant la liaison du système de traduction. Cette configuration entraîne l'expression à haut niveau de la céphalosporinase et, en conséquence, la résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération comme la ceftazidime. *ISAbal* est également identifiée 7 pb en amont du codon d'initiation du gène codant pour l'oxacillinase naturelle OXA-51 ainsi qu'en amont des gènes codant pour les oxacillinasés acquises OXA-23, OXA-27 et OXA-58 respectivement à 34, 34 et 10 pb en amont leur codon d'initiation. Cette configuration confère une diminution de la sensibilité voire une résistance à l'imipénème. *ISAbal* est identifiée 21 pb en amont du codon d'initiation du gène *sul2* conférant ainsi une résistance aux sulfonamides (Héritier et coll. 2005; Segal et coll. 2005 ; Poirel et coll. 2006c ; Turton et coll. 2006).

✓ **Acquisition de gène** : une récente étude sur l'environnement génétique du gène *bla_{OXA-23}* localisé sur un plasmide de *A. baumannii* a permis de caractériser un transposon composite formé par deux séquences *ISAbal* en orientation opposée encadrant ce gène de résistance. Cette étude a montré que *ISAbal* pourrait être à l'origine de l'acquisition et de la mobilisation du gène *bla_{OXA-23}* (Corvec et coll. 2007).

1.3.2. *ISAbal4*

ISAbal4 appartient à la famille IS982. Cet élément de 975 pb, possède des IR imparfaites de 22 pb et code pour une transposase putative de 292 acides aminés. Aucun site de duplication n'est observé de part et d'autre de *ISAbal4*. Cet élément est associé au gène *bla_{OXA-23}* au sein du transposon Tn2007 (Corvec et coll. 2007).

2. Les transposons

2.1. Les transposons de classe I

Les transposons de classes I sont des transposons composites, encadrés par deux copies de la même IS. Lors de la transposition d'une IS, la transposase reconnaît soit ses deux IR soit son IR gauche et l'IR droite de la deuxième copie. Cela peut générer le déplacement des deux IS. Par conséquent, il peut y avoir une mobilisation de la séquence d'ADN incluse entre les deux IS. Cette séquence peut contenir des gènes de résistance. Le gène *bla*_{OXA-23} est associé à cette structure chez *A. baumannii* (Figure 10) (Corvec et coll. 2007 ; Adams-Haduch et coll. 2008).

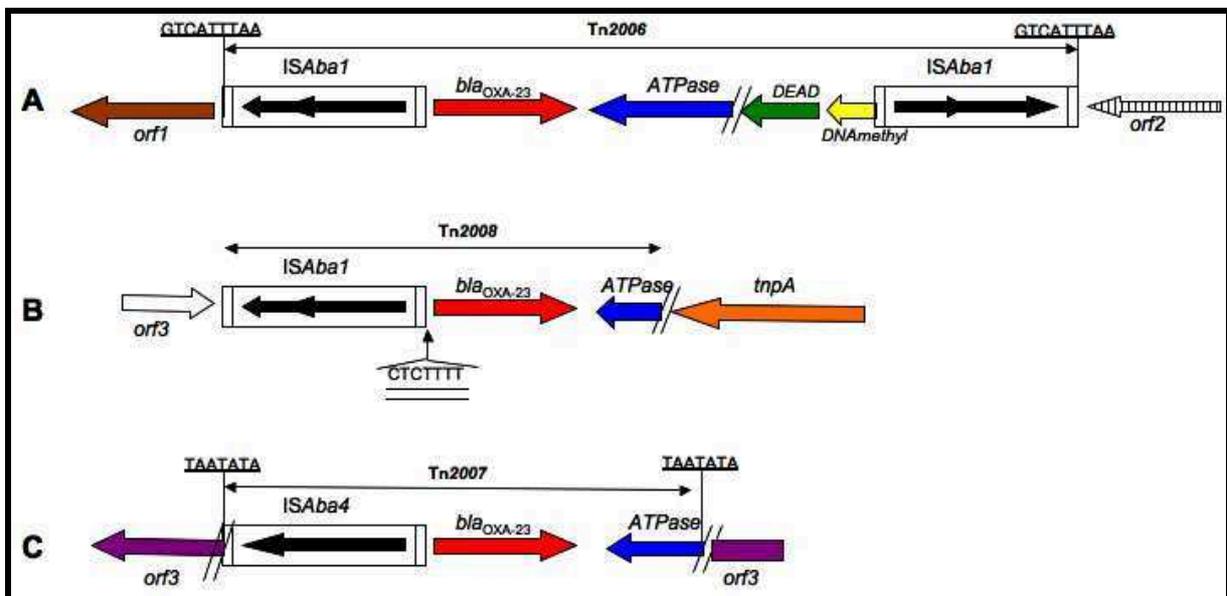


Figure 10. Transposons associés au gène *bla*_{OXA-23} chez *A. baumannii*.

(A) Tn2006, (B) Tn2008, (C) Tn2007.

Les sites de duplication générés lors de la transposition sont soulignés. La différence de 7-pb au niveau du site d'insertion de ISAbal dans Tn2008 est soulignée deux fois. Les phases ouvertes de lecture *orf1*, *orf2*, et *orf3* correspondent à des gènes de fonction inconnue ; *tnpA*, gène codant pour une transposase putative ; *ATPase*, gène codant pour une putative AAA ATPase ; *DEAD*, gène codant pour une hélicase DEAD ; *DNA*_{methyl}, gène codant pour une ADN méthylase.

2.2. Les transposons de classe II

Les transposons de classe II diffèrent, dans leur structure, par rapport aux transposons de classe I (Figure 11). Ces transposons n'ont pas deux copies d'une IS mais une séquence d'ADN incluse entre deux séquences répétées inversées. Cette séquence d'ADN peut contenir des gènes de résistance. Une transposase permet la mobilisation de cette séquence d'ADN située entre les IR (Libert et coll. 1999).

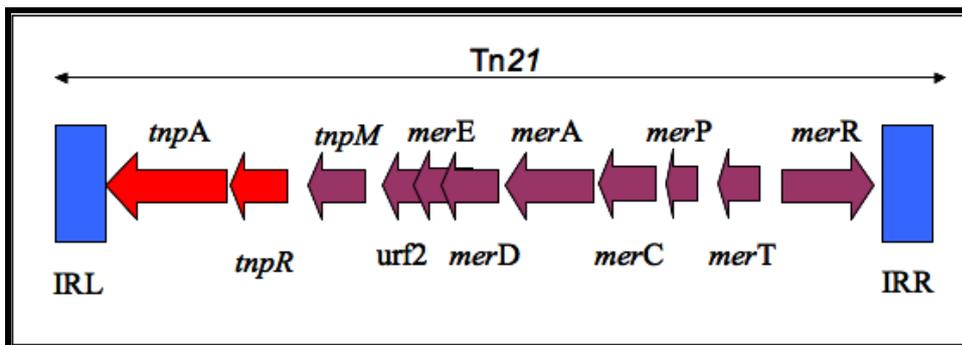


Figure 11. Organisation d'un transposon de classe II : exemple du transposon Tn21. Les transposons de classe II sont formés d'une transposase et d'une séquence d'ADN plus ou moins longue, situées entre deux IR. La transposase reconnaît les deux IR permettant la mobilisation. Les boîtes bleues représentent les IR gauche et droite de l'IS. Les gènes *tnpA* et *tnpR* codant pour la transposase et la résolvasse sont indiqués en rouge. Les flèches violettes représentent les gènes codant pour les protéines impliquées dans la résistance au mercure.

2.3. Les transposons conjugatifs

Les transposons conjugatifs partagent des propriétés communes avec les éléments génétiques transposables classiques : ils sont capables de s'exciser et de s'insérer dans de multiples endroits au sein d'une molécule d'ADN. Ces éléments génétiques se composent de différents gènes codant pour une transposase et des protéines nécessaires au transfert conjugatif. Le spectre d'hôte des transposons conjugatif est large, ce qui permet des transferts vers la quasi-totalité des bactéries à Gram positif mais également vers les bactéries à Gram négatif. Ces transposons véhiculent des gènes de résistance comme, par exemple, des gènes de résistance aux tétracyclines (Salyers et coll. 1995).

3. Les intégrons de classe 1

Les intégrons de classe 1 sont les plus répandus dans les souches cliniques et constituent un véritable système de capture et d'expression de gènes. L'intégron en lui-même est une structure immobile. Ces intégrons sont constitués de deux régions conservées 5'-CS et 3'-CS (99% et 90% d'identité parmi les intégrons de classe 1, respectivement) situées de part et d'autre d'une région variable au sein de laquelle viennent s'insérer les gènes cassettes (Figure 12). Ces gènes cassettes sont constitués généralement d'un gène unique, le plus souvent un gène de résistance aux antibiotiques et d'un site de recombinaison appelé *attC* ou élément de 59 pb (59-be). Les gènes cassettes peuvent être recrutés individuellement à partir d'un autre intégron ou bien déplacés au sein d'un même intégron par recombinaison spécifique de site. La région 5' conservée (5'-CS) contient le gène *intI* codant une intégrase, le site adjacent *attI*, qui est reconnu par cette intégrase et agit comme site receveur de cassettes de gènes et des séquences promotrices P_{ant} à partir duquel les gènes intégrés sont co-transcrits (Hall et collis. 1995). La région 3'-CS comprend 3 phases ouvertes de lecture : *qacEΔ1*, confère la résistance aux antiseptiques ; *sul1*, confère la résistance aux sulfamides ; *orf5*, phase ouverte de lecture de fonction inconnue.

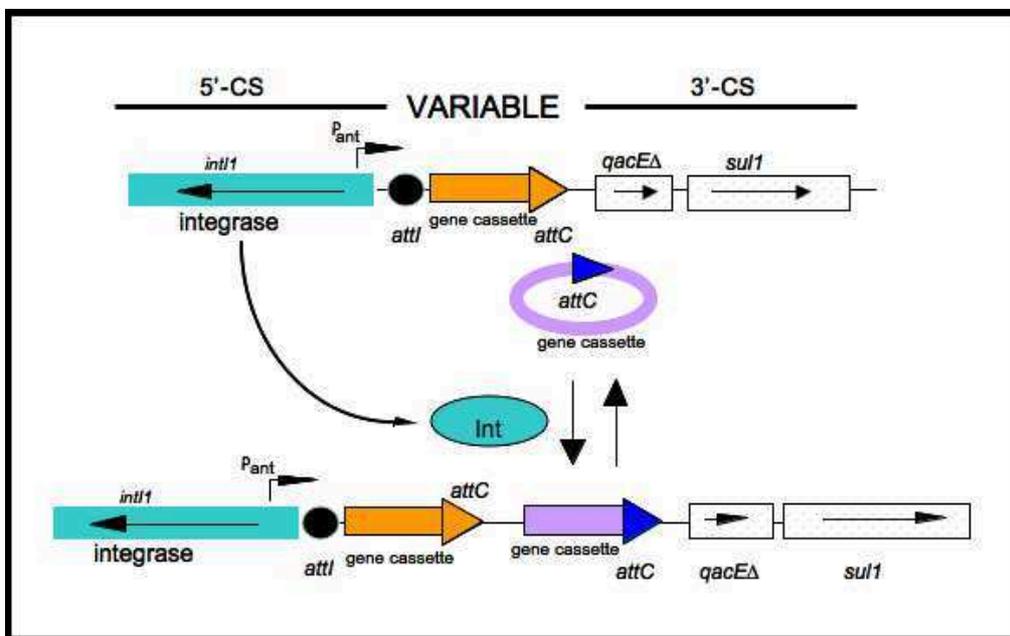


Figure 12. Structure générale d'un intégron de classe 1 et mouvement des gènes cassettes. L'intégrase *IntI* catalyse l'intégration et l'excision des cassettes. L'intégration des gènes cassettes se fait par recombinaison homologue entre leur site *attC* et le site *attI*. Les régions conservées 5'-CS et 3'-CS sont soulignées en noir.

Objectifs scientifiques

OBJECTIFS SCIENTIFIQUES

Les épidémies à *A. baumannii* résistants aux carbapénèmes sont rapportées de manière croissante dans le monde entier. Cette résistance aux carbapénèmes est le plus souvent liée à la production de β -lactamases de classe D à activité de carbapénémase (CHDLs) : OXA-23, OXA-40, OXA-58 et OXA-143. Ces gènes, qui ne sont pas naturellement présents sur le chromosome de *A. baumannii*, ont été caractérisés au sein de structures génétiques mobiles, souvent de type transposons composites. Il semble donc que ces gènes aient été secondairement acquis par *A. baumannii* à partir de source(s) inconnue(s). De plus, *A. baumannii* possède intrinsèquement un gène codant pour une CHDL : le gène de type *bla*_{OXA-51}, dont la contribution exacte à la résistance aux carbapénèmes chez *A. baumannii* est controversée.

Les objectifs scientifiques de notre travail étaient les suivants :

- ✓ Recherche des progéniteurs des gènes codant pour les CHDLs connus chez *A. baumannii* : *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-40}, *bla*_{OXA-58} et *bla*_{OXA-143}.
- ✓ Identification de gènes de β -lactamases naturels de différentes espèces de *Acinetobacter* spp.
- ✓ Amélioration du diagnostic d'espèce des souches de *Acinetobacter* spp. par des techniques génétiques basées sur l'identification de leurs gènes naturels de CHDL.
- ✓ Caractérisation de la contribution de ces gènes naturels de CHDL à la résistance aux carbapénèmes chez *Acinetobacter*, en étudiant l'expression du gène *bla*_{OXA-51} naturellement présent chez *A. baumannii*.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

A : Identification du progéniteur du gène bla_{OXA-23} conférant une résistance aux carbapénèmes chez *A. baumannii* (Article 1)

Notre hypothèse de travail était la suivante : le progéniteur du gène bla_{OXA-23} pourrait être une espèce proche de *A. baumannii* et notamment appartenir au genre *Acinetobacter*.

En effet:

- ✓ le gène bla_{OXA-23} a été identifié quasi exclusivement chez *A. baumannii*, pouvant suggérer un spectre d'hôte restreint pour les structures génétiques à l'origine de la diffusion de ce gène
- ✓ *ISAbal*, impliquée dans l'acquisition du gène bla_{OXA-23} , est également identifiée essentiellement chez *A. baumannii*
- ✓ Le GC% du gène bla_{OXA-23} et des structures en aval au sein de Tn2006 (Figure 13) est comparable à celui du reste du génome d'espèces bactériennes appartenant au genre *Acinetobacter* (voisin de 38%)
- ✓ En aval du gène bla_{OXA-23} au sein de Tn2006 et Tn2007, un gène a été identifié codant pour une ATPase présentant 83% d'identité en acides aminés avec une ATPase présente chez *Acinetobacter baylyi* dont le génome entier a été séquencé

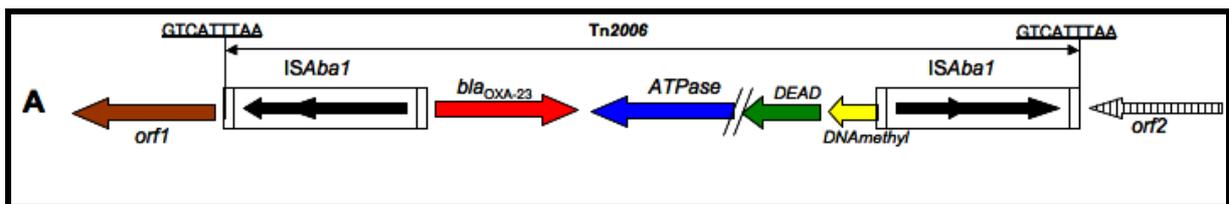


Figure 13. Tn2006 : un transposon associé au gène bla_{OXA-23} chez *A. baumannii*.

Les sites de duplication générés lors de la transposition sont soulignés. Les phases ouvertes de lecture *orf1* et *orf2* correspondent à des gènes de fonction inconnue ; ATPase, gène codant pour une putative AAA ATPase ; DEAD, gène codant pour une hélicase DEAD ; DNAmethyl, gène codant pour une ADN méthylase.

1. Recherche du gène *bla*_{OXA-23} au sein de souches de *Acinetobacter* spp.

Nous avons étudié des souches cliniques de provenance internationale, ainsi que des souches de référence. Notre panel comportait 50 souches de *Acinetobacter* sp. appartenant à 14 espèces différentes incluant *A. junii*; *A. johnsonii*; *A. haemolyticus*; *A. baylyi*; *A. lwoffii*; *A. radioresistens*; *A. schindleri*; *A. ursingii*; et *Acinetobacter* genomic species 3, 10, 13, 15, 16, et 17.

L'amplification par PCR utilisant des couples d'amorces nucléotidiques spécifiques du gène *bla*_{OXA-23} (Tableau 17) a été positive pour les deux souches de *A. radioresistens*, dites A et B (Figure 14) dont nous disposons dans notre collection. Cette PCR a également donné un résultat positif pour 2 autres souches de *A. radioresistens* que nous nous sommes procurées dont une provenant de la Collection de l'Institut Pasteur, Paris, France (*A. radioresistens* C, (Figure 14) et l'autre provenant du CHU H. Mondor, Créteil, France (don de V. Cattoir et CJ Soussy) (*A. radioresistens* D).

Cette même PCR a été négative pour toutes les autres souches testées.

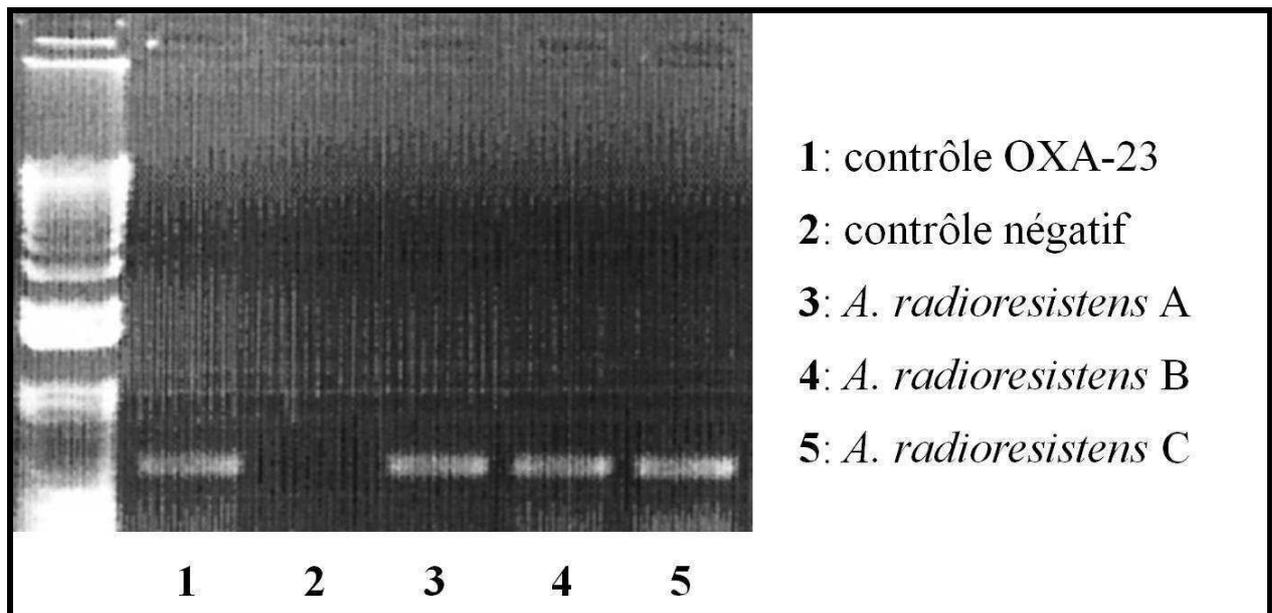


Figure 14. Amplification du gène *bla*_{OXA-23} de trois souches de *A. radioresistens* par Polymerase Chain Reaction (PCR). La PCR a été réalisée en utilisant le couple d'amorces nucléotidiques PréOXA-23A et PréOXA23-B spécifiques de ce gène.

2. Recherche des structures génétiques identifiées en aval du gène *bla*_{OXA-23} au sein de Tn2006 et de Tn2007 chez *A. radioresistens*

Chez *A. baumannii*, le gène *bla*_{OXA-23} a été acquis grâce à deux structures génétiques mobiles : Tn2006 contenant IS*Aba1* et Tn2007 contenant IS*Aba4*. Un gène codant pour une ATPase a également été identifié en aval du gène *bla*_{OXA-23} dans Tn2006 et Tn2007, suggérant que ce gène codant pour l'ATPase était présent chez le progéniteur du gène *bla*_{OXA-23} et a été mobilisé en même temps que ce dernier. Il nous est donc apparu utile de rechercher par PCR la présence d'IS*Aba1*, IS*Aba4* et du gène codant pour l'ATPase dans les souches de *A. radioresistens*.

Alors qu'aucune souche de *A. radioresistens* ne possédait IS*Aba1* ou IS*Aba4*, le gène codant pour l'ATPase a été identifié dans les quatre souches de *A. radioresistens*. L'analyse des séquences nucléotidiques de ce gène a montré 97% d'identité nucléotidique entre la séquence codant pour l'ATPase de *A. radioresistens* A et celle de *A. baumannii* Ab 13 au sein de laquelle Tn2006 a été décrite. L'identité en acides aminés entre ces 2 ATPases était de 100%.

3. Séquençage et analyse nucléotidique des produits de PCR purifiés du gène *bla*_{OXA-23} identifiés à partir des quatre souches de *A. radioresistens*

L'analyse des séquences nucléotidiques des produits de PCR purifiés du gène *bla*_{OXA-23} obtenus dans les quatre souches de *A. radioresistens* montre qu'une de ces souches présentait 100% d'identité en acides aminés avec la protéine OXA-23 identifiée auparavant chez *A. baumannii*. Les trois autres présentaient trois variants de OXA-23 ne comportant que quelques substitutions en acides aminés par rapport à cette enzyme. Ces nouveaux gènes ont été nommés *bla*_{OXA-102}, *bla*_{OXA-103} et *bla*_{OXA-105} en accord avec la nomenclature internationale (G. Jacoby, K. Bush, www.lahey.org/studies/webt.html).

Les résultats sont présentés dans le Tableau 4.

Tableau 5. Analyse des séquences nucléotidiques obtenues après séquençage des produits de PCR purifiés du gène *bla*_{OXA-23} identifiés dans quatre souches de *A. radioresistens*.

	<i>A. radioresistens</i> A	<i>A. radioresistens</i> B	<i>A. radioresistens</i> C	<i>A. radioresistens</i> D
Pourcentage d'identité nucléotidique avec le gène <i>bla</i> _{OXA-23}	100% = <i>bla</i> _{OXA-23}	96% = <i>bla</i> _{OXA-102}	98% = <i>bla</i> _{OXA-103}	98% = <i>bla</i> _{OXA-105}
Nombre de mutations en acides aminés versus OXA-23	0	6	3	3

4. Étude de l'expression des gènes de type *bla*_{OXA-23} chez *A. radioresistens*

▪ Antibiogrammes

Les antibiogrammes des quatre souches de *A. radioresistens* montraient une sensibilité à toutes les classes d'antibiotiques, et en particulier une sensibilité élevée à toutes les β -lactamines. L'antibiogramme d'une souche de *A. radioresistens*, *A. radioresistens* C, est représenté à titre d'exemple Figure 15.

▪ Extraction des β -lactamases, détermination des points isoélectriques et activités enzymatiques spécifiques comparées

Aucune activité hydrolytique n'a été mise en évidence à partir des extraits de culture des quatre souches de *A. radioresistens* en utilisant comme substrats céfalotine et imipénème (résultats non montrés). Ce résultat est également en faveur d'une absence d'expression du gène *bla*_{OXA-23} dans ces souches, mais aussi d'une absence d'expression de tout autre gène de β -lactamase (par exemple *bla*_{AmpC}).

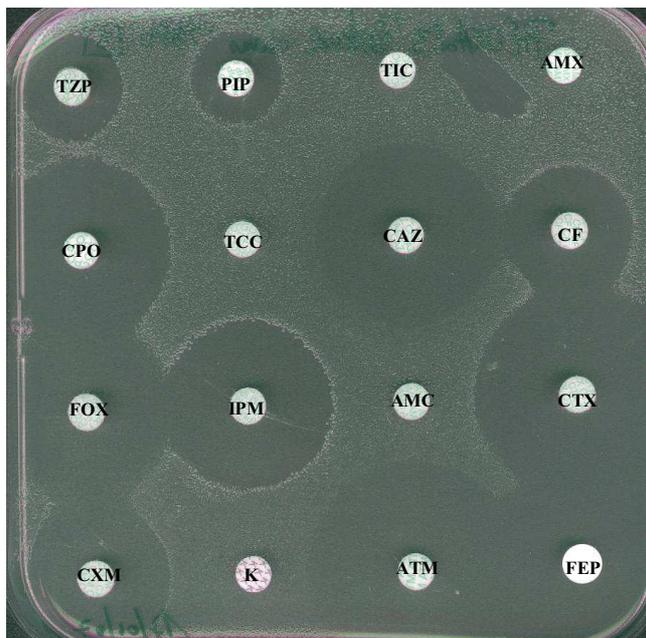
5. Expression comparée des quatre variants du gène *bla*_{OXA-23} identifiés chez *A. radioresistens*

Afin de mettre en évidence d'éventuelles différences de spectre de substrats entre les variants du gène *bla*_{OXA-23} identifiés chez *A. radioresistens*, nous avons réalisé le clonage de ces gènes dans un plasmide ayant son propre promoteur et introduit ces plasmides recombinants chez *E. coli* TOP10. Ces souches recombinantes exprimaient un profil identique d'oxacillinase à activité de carbapénémase quel que soit le variant du gène *bla*_{OXA-23} considéré. L'antibiogramme de la souche *E. coli* TOP10 possédant le plasmide recombinant pTOPO-OXA-103 est représenté Figure 16.

Figure 15. Antibiogramme de *A. radioresistens* C possédant le gène *bla*_{OXA-103}.



Figure 16. Antibiogramme de *E. coli* TOP10 (pTOPO-OXA-103) exprimant OXA-103.



Les abréviations utilisées sont les suivantes :

TZP : pipéracilline + tazobactam ; PIP : pipéracilline ; TIC : ticarcilline ; AMX : amoxicilline ; CPO : cefpirome ; TCC : ticarcilline + acide clavulanique ; CAZ : ceftazidime ; CF : cefalotine ; FOX : cefoxitine ; IPM : imipénème ; AMC : amoxicilline + acide clavulanique ; CTX : cefotaxime ; CXM : cefuroxime ; K : kanamycine ; ATM : aztréonam ; FEP : cefepime ; NA : acide nalidixique ; NOR : norfloxacine ; OFX : ofloxacine ; CIP : ciprofloxacine ; CS : colistine ; RA : rifampicine ; TE : tétracycline ; LVX : levofloxacine ; S : streptomycine ; TMP : triméthoprime ; C : chloramphénicol ; NET : netilmicine ; GM : gentamicine ; AN : amikacine ; TM : tobramycine ; MOX : moxalactam

6. Caractéristiques enzymatiques et activités enzymatiques spécifiques comparées des quatre variants de la β -lactamase OXA-23 surexprimés chez *E. coli*

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) pour les carbapénèmes des quatre souches recombinantes de *E. coli* contenant les plasmides pTOPO-OXA-23 ou analogues ont été déterminées. Les résultats sont présentés dans le Tableau 5. Alors que les CMI pour l'imipénème étaient identiques entre les quatre souches recombinantes, celle possédant le gène *bla*_{OXA-23} présentait une CMI plus basse pour l'ertapénème et dans une moindre mesure pour le méropénème que les 3 autres. Afin d'évaluer si ces différences de CMI s'expliquent par une différence d'hydrolyse entre OXA-23 et les 3 variants, des mesures d'activités enzymatiques spécifiques comparées complémentaires sont nécessaires.

Tableau 6. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) d'imipénème (IMP), d'ertapénème (ETP) et de méropénème (MP) des quatre variants de la β -lactamase OXA-23 dont les gènes ont été clonés par le plasmide TOPO et surexprimés chez *E. coli* TOP10.

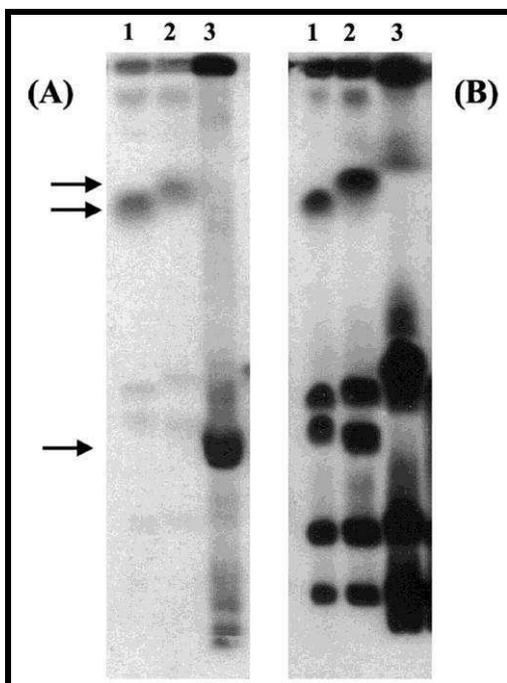
	CMI ($\mu\text{g/ml}$)		
	IMP	ETP	MP
Clone <i>bla</i> _{OXA-23} dans TOPO/ <i>E. coli</i> TOP10	1	0.01	0.05
Clone <i>bla</i> _{OXA-102} dans TOPO/ <i>E. coli</i> TOP10	1	0.12	0.1
Clone <i>bla</i> _{OXA-103} dans TOPO/ <i>E. coli</i> TOP10	1	0.12	0.1
Clone <i>bla</i> _{OXA-105} dans TOPO/ <i>E. coli</i> TOP10	1	0.12	0.1
<i>E. coli</i> TOP10	0.12	0.01	0.02

7. Etude du support génétique des gènes de type *bla*_{OXA-23} identifiés chez *A. radioresistens* (Figure 17)

Pour déterminer la localisation chromosomique ou plasmidique des gènes de type *bla*_{OXA-23} dans deux souches de *A. radioresistens*, nous avons procédé de la manière suivante. Après extraction, l'ADN total de deux souches de *A. radioresistens* et d'une souche de *A. baumannii* avec le gène *bla*_{OXA-23} (Ab 583) a été restreint par l'endonucléase I-CeuI qui reconnaît un site de 26 pb au sein des gènes codant pour la sous-unité 16S de l'ARNr, localisé sur le

chromosome. Nous avons ensuite réalisé une électrophorèse en champ pulsé puis une hybridation avec des sondes spécifiques de *bla*_{OXA-23} et des gènes codant pour l'ARNr 16S. Les résultats obtenus sont représentés Figure 17. Pour les deux souches de *A. radioresistens*, un même fragment d'ADN restreint co-hybride avec les deux sondes utilisées, ce qui est en faveur d'une localisation chromosomique des gènes de type *bla*_{OXA-23} chez *A. radioresistens*. A l'inverse, pour la souche de *A. baumannii*, le fragment hybridant avec la sonde spécifique de *bla*_{OXA-23} n'hybride pas avec la sonde ARN16S, ce qui est en faveur d'un support plasmidique du gène *bla*_{OXA-23}.

Figure 17. Identification du support des gènes de type *bla*_{OXA-23} dans les souches de *A. radioresistens*. Pistes 1 : *A. radioresistens* souche C; pistes 2 : *A. radioresistens* souche B; pistes 3 : *A. baumannii* souche Ab13 possédant le gène *bla*_{OXA-23} sur un plasmide. L'hybridation a été réalisée avec des sondes spécifiques de *bla*_{OXA-23} (A) et des gènes codant pour l'ARNr 16S (B). Les flèches horizontales montrent les sites d'hybridation avec la sonde *bla*_{OXA-23}. Pour les deux souches de *A. radioresistens*, un même fragment d'ADN restreint co-hybride avec les deux sondes utilisées, ce qui est en faveur d'une localisation chromosomique des gènes de type *bla*_{OXA-23} chez *A. radioresistens*. A l'inverse, pour la souche de *A. baumannii*, le fragment hybridant avec la sonde spécifique de *bla*_{OXA-23} n'hybride pas avec la sonde ARN16S, ce qui est en faveur d'un support plasmidique du gène *bla*_{OXA-23}.



8. Recherche du réservoir de *A. radioresistens* et du lieu éventuel d'échange du gène bla_{OXA-23} entre *A. baumannii* et *A. radioresistens*

A. radioresistens a été principalement décrit comme faisant partie de la flore commensale cutanée de sujets sains et de patients hospitalisés, comme *A. baumannii* (Seifert et coll. 1997 ; Berlau et coll. 1999). Nous avons donc émis l'hypothèse que le lieu d'échange du gène bla_{OXA-23} entre *A. radioresistens* et *A. baumannii* pourrait être la peau. La présence concomitante de ces deux germes a été recherchée en réalisant une centaine de prélèvements cutanés par écouvillons à l'hôpital de Bicêtre (données non montrées). Alors que 4 souches de *A. baumannii* ont été isolées, aucune souche de *A. radioresistens* n'a été isolée dans cette étude.

Dans ce travail, le progéniteur du gène bla_{OXA-23} impliqué dans la multirésistance aux antibiotiques et en particulier aux carbapénèmes chez *A. baumannii* a été identifié. Il s'agit de *A. radioresistens*.

De plus, trois nouvelles oxacillinases à activité de carbapénémase proches de OXA-23 ont été identifiées : OXA-102, OXA-103 et OXA-105.

B : Caractérisation de OXA-134, oxacillinase à activité de carbapénèmase de *A. lwoffii* (Article 2)

Alors que *Acinetobacter radioresistens* a été identifié comme progéniteur du gène bla_{OXA-23} , codant pour la CHDL acquise la plus répandue OXA-23, les progéniteurs des autres CHDLs acquises identifiées chez *A. baumannii*, notamment OXA-40, OXA-58 et OXA-143, restent inconnus. Nous avons émis l'hypothèse que d'autres espèces de *Acinetobacter* spp. pouvaient être des réservoirs de gènes codant des CHDLs connues ou inconnues.

1. Recherche de gènes de type bla_{OXA-23} , bla_{OXA-40} , bla_{OXA-58} , et $bla_{OXA-143}$, au sein de souches de *Acinetobacter* spp.

Nous avons enrichi notre collection de souches appartenant au genre *Acinetobacter* avec un total de 23 espèces incluant *A. junii*, *A. johnsonii*, *A. haemolyticus*, *A. baylyi*, *A. lwoffii*, *A. radioresistens*, *A. schindleri*, *A. ursingii*, *A. calcoaceticus*, *A. gernerii*, *A. tjernbergiae*, *A. bouvetii*, *A. tandoii*, *A. grimontii*, *A. townneri*, *A. parvus* et *Acinetobacter* genomospecies 3, 6, 9, 10, 13, 15, 16 et 17. Il convient de noter que *Acinetobacter* genomospecies 9 et *A. lwoffii* sont considérés comme synonymes et regroupés sous le même nom d'espèce : *A. lwoffii* (Peleg et coll. 2008). Une recherche des gènes codant pour les CHDLs connues : bla_{OXA-23} , bla_{OXA-40} , bla_{OXA-58} , $bla_{OXA-143}$ a été réalisée par PCR en utilisant des amorces internes (Tableau 17). Des résultats négatifs ont été obtenus pour les gènes de type bla_{OXA-40} , bla_{OXA-58} et $bla_{OXA-143}$ pour toutes les souches testées. Des résultats positifs ont été obtenus uniquement pour la détection du gène bla_{OXA-23} pour une souche de *A. radioresistens* (souche C) (tableau avec toutes les souches) et la souche 1 de *A. lwoffii*. Après séquençage, le produit de PCR obtenu pour la souche 3 de *A. radioresistens* correspondait au gène bla_{OXA-23} naturellement présent sur son chromosome comme précédemment décrit (Article 1, Poirel et coll. 2008a). Le séquençage de l'amplicon obtenu à partir de la souche 1 de *A. lwoffii* a permis d'identifier un nouveau type de β -lactamase. Des expériences de TAIL-PCR ont permis d'obtenir la séquence entière du gène codant pour une protéine de 273 acides aminés nommée OXA-134a qui partage 63%, 58%, 57% et 53% d'identité en acides aminés avec OXA-23, OXA-51, OXA-40 et OXA-58, respectivement. OXA-134a possède des éléments caractéristiques des β -lactamases de classe D, comme la tétrade STFK en position DBL 70 à 73. De plus, comme c'est le cas pour les autres CHDLs (à l'exception de OXA-58), un motif FGN en position

DBL 144 à 146 remplaçait le motif YGN habituellement décrit à ces positions chez les β -lactamases de classe D classiques. Le motif KSG a été identifié en position DBL 216 à 218 comme observé pour les CHDLs OXA-40, OXA-58 et OXA-51, alors que le motif KTG est présent dans la plupart des β -lactamases de classe D, y compris la CHDL OXA-23 (Poirel et coll. 2010) (Figure 19). Une analyse phylogénétique montre que OXA-134 constitue un sous-groupe de CHDLs à part entière, mais plus proche des CHDLs identifiées chez *Acinetobacter* spp. que des autres CHDLs (Figure 18).

Afin d'évaluer si le gène *bla*_{OXA-134} était naturellement présent au sein de l'espèce *A. lwoffii*, la recherche de ce gène a été réalisée par PCR au sein d'une collection d'ADN de 10 isolats de *A. lwoffii* collectés à partir d'échantillons cliniques des hôpitaux de Bicêtre et de Cologne. Les résultats ont montré que tous les isolats possédaient un gène de type *bla*_{OXA-134}. Le séquençage des amplicons a permis d'identifier six dérivés de OXA-134 dénommés OXA-186 à OXA-191, différant de 3 à 18 acides aminés (Figure 19). Alors que OXA-134 et OXA-186 possédaient 273 acides aminés, les cinq autres variants possédaient 3 acides aminés en plus (Figure 19). Dans trois isolats, le gène *bla*_{OXA-134} était interrompu avec des substitutions nucléotidiques localisées dans le centre du gène ce qui conduisait à l'interruption de la phase ouverte de lecture.

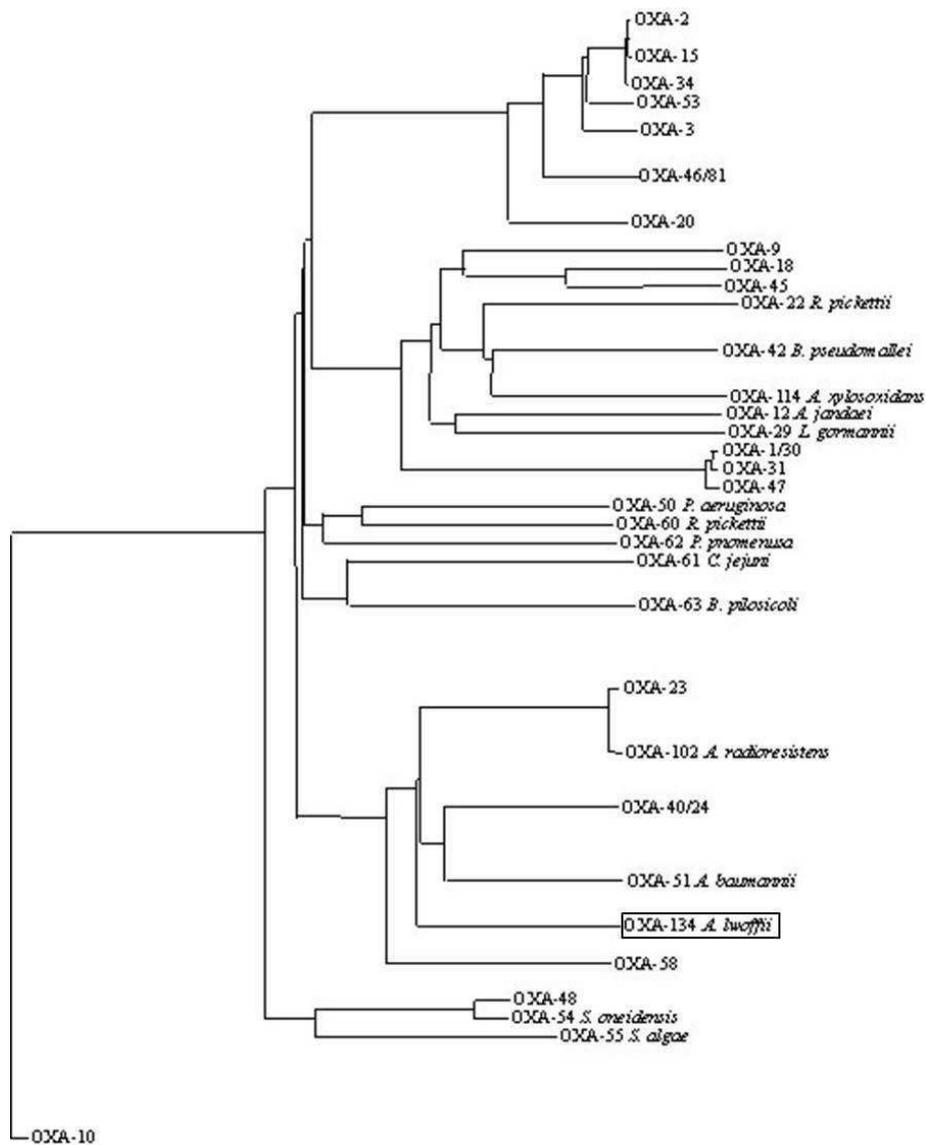


Figure 18. Dendrogramme obtenu pour 32 β -lactamases de classe D.

Le dendrogramme a été élaboré par la méthode phylogénétique de « neighbor joining ». La longueur des branches est proportionnelle au nombre de changements d'acides aminés. La distance le long de l'axe vertical n'est pas significative. Les différentes classes ont permis l'identification de neuf principaux groupes, en considérant que les protéines appartenant au même groupe possèdent 80 % d'identité en acides aminés. Les β -lactamases de classe D considérées comme naturelles sont indiquées à côté de l'espèce qui l'abrite naturellement. *R. pickettii*, *Ralstonia pickettii*; *B. pseudomallei*, *Burkholderia pseudomallei*; *A. xylosoxidans*, *Alcaligenes xylosoxidans*; *A. jandaei*, *Aeromonas jandaei*; *L. gormanii*, *Legionella gormanii*; *P. aeruginosa*, *Pseudomonas aeruginosa*; *P. pnomenusa*, *Pandoraea pnomenusa*; *C. jejuni*, *Campylobacter jejuni*; *B. pilosicoli*, *Brachyspira pilosicoli*; *S. oneidensis*, *Shewanella oneidensis*; *S. algae*, *Shewanella algae*.

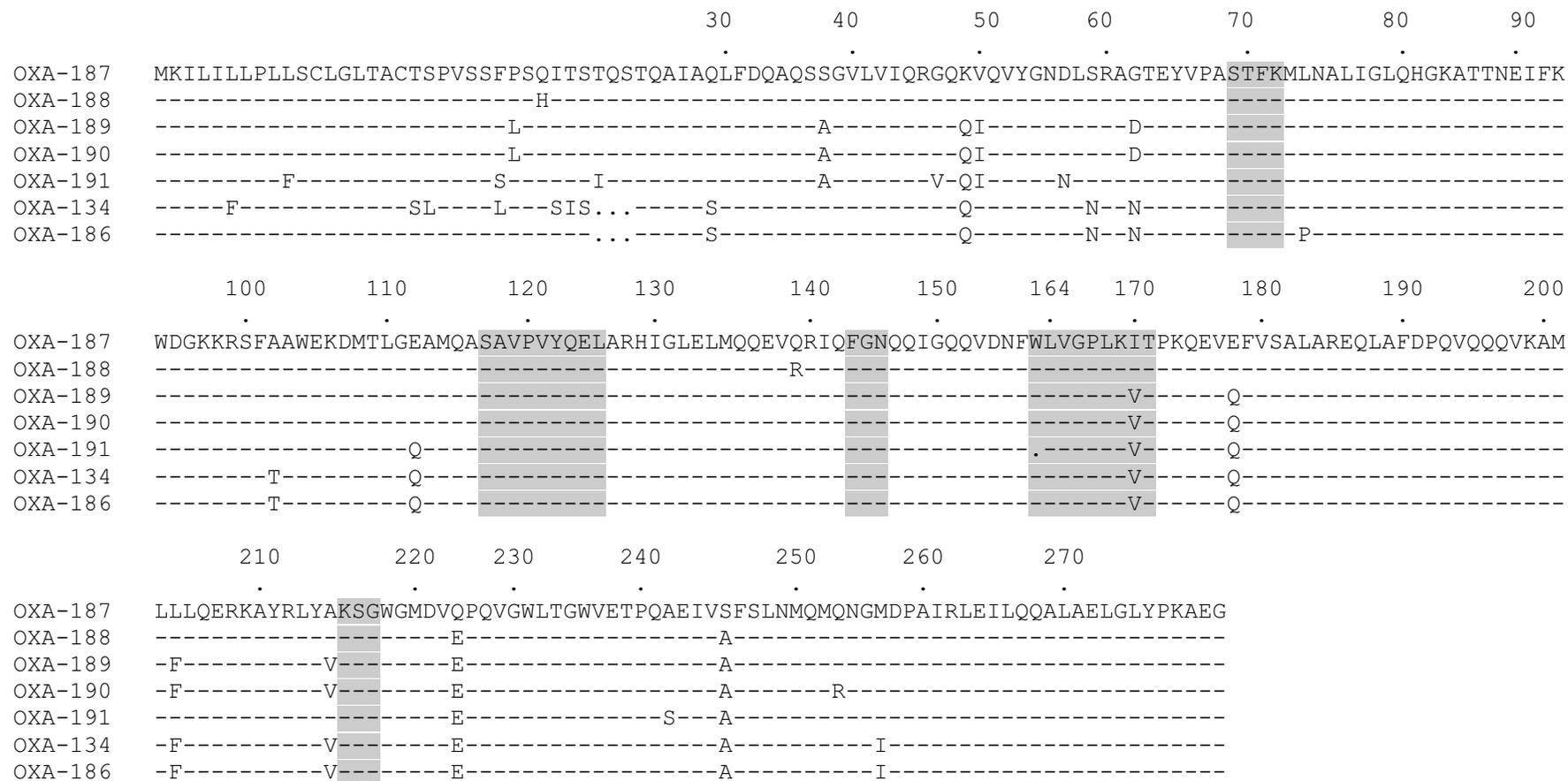


Figure 19. Alignement des 7 séquences protéiques correspondant aux β -lactamases OXA-134-like.

Les tirets indiquent les acides aminés identiques comparés à la séquence OXA-134. Les motifs conservés des β -lactamases sont indiqués en gris.

La numérotation correspond à la numérotation des enzymes de classe D (Couture et coll. 1992).

2. Étude de l'expression des gènes de type *bla*_{OXA-134} chez *A. lwoffii*

▪ Antibiogramme

Les antibiogrammes de toutes les souches de *A. lwoffii* montraient une sensibilité à toutes les classes d'antibiotiques, et en particulier une sensibilité à toutes les β -lactamines dont les carbapénèmes. L'antibiogramme de la souche de *A. lwoffii*/*Acinetobacter* genomic species 9 CIP64.7 est représenté à titre d'exemple Figure 20.

▪ Extraction des β -lactamases, détermination des points isoélectriques et activités enzymatiques spécifiques comparées

Aucune activité de β -lactamase n'a été mise en évidence à partir des extraits de culture des souches de *A. lwoffii* en utilisant comme substrats céfalotine et imipénème (résultats non montrés). Ce résultat est également en faveur d'une absence d'expression du gène *bla*_{OXA-134} dans ces souches, mais aussi d'une absence d'expression de tout autre gène de β -lactamase (par exemple *bla*_{AmpC}).

3. Expression comparée des variants du gène *bla*_{OXA-134} identifiés chez *A. lwoffii*

Dans le but d'étudier les propriétés biochimiques de OXA-134, le gène correspondant a été cloné dans le vecteur recombinant pCR-BluntII-TOPO et exprimé chez *E. coli* TOP10. La bactérie recombinante *E. coli* TOP10 pOXA-134 a montré un phénotype de résistance en accord avec l'expression d'une CHDL. Nous avons observé une réduction de la sensibilité à l'imipénème et au méropénème, et une résistance à presque toutes les pénicillines qui n'est pas inhibée par les inhibiteurs des β -lactamases. Ces résultats sont résumés dans le tableau 6. Pour compléter la caractérisation de l'activité de OXA-134, l'enzyme a été purifiée à partir de cultures de *E. coli* contenant le plasmide recombinant pOXA-134 et ces caractéristiques enzymatiques ont été déterminées. La β -lactamase OXA-134 a montré un profil d'hydrolyse étroit, incluant les pénicillines (Tableau 7). Les taux d'hydrolyse de l'imipénème et du méropénème étaient très bas, alors que les CMI pour les carbapénèmes pour *E. coli* TOP10 exprimant OXA-134 étaient augmentées de 3 fois (Tableau 6). De manière générale, l'activité catalytique obtenue avec OXA-134 était similaire à celles de OXA-58 et OXA-40, surtout pour les valeurs des carbapénèmes. Pour évaluer si les acides aminés supplémentaires de

certaines variants OXA-134 conféraient un profil de résistance différent aux β -lactamines, le gène *bla*_{OXA-134c} choisi comme représentant a été cloné et exprimé de la même manière que le gène *bla*_{OXA-134a}. Les CMI des β -lactamines pour *E. coli* pOXA-134c étaient similaires à celles comparées de *E. coli* pOXA-134a, montrant que ces acides aminés additionnés ne jouaient pas un rôle significatif dans l'hydrolyse des antibiotiques.

Figure 20. Antibiogramme de *A. lwoffii*/*Acinetobacter* genomic species 9 CIP 64.7 possédant le gène *bla*_{OXA-134}.



Figure 21. Antibiogramme de *E. coli* TOP10 (pTOPO-OXA-134) exprimant OXA-134.



Les abréviations utilisées sont les suivantes :

TZP : pipéracilline + tazobactam ; PIP : pipéracilline ; TIC : ticarcilline ; AMX : amoxicilline ; CPO : cefpirome ; TCC : ticarcilline + acide clavulanique ; CAZ : ceftazidime ; CF : cefalotine ; FOX : cefoxitine ; IPM : imipénème ; AMC : amoxicilline + acide clavulanique ; CTX : cefotaxime ; CXM : cefuroxime ; K : kanamycine ; ATM : aztréonam ; FEP : cefepime ; NA : acide nalidixique ; NOR : norfloxacine ; OFX : ofloxacine ; CIP : ciprofloxacine ; CS : colistine ; RA : rifampicine ; TE : tétracycline ; LVX : levofloxacine ; S : streptomycine ; TMP : triméthoprime ; C : chloramphénicol ; NET : netilmicine ; GM : gentamicine ; AN : amikacine ; TM : tobramycine ; MOX : moxalactam

Tableau 7. CMI des β -lactamines pour les isolats *A. lwoffii*, *E. coli* TOP10 pOXA-134 et la souche de référence *E. coli* TOP10.

β -Lactamine (s) ^a	Isolats <i>A. lwoffii</i>	<i>E. coli</i> TOP-10 (pOXA-134)	<i>E. coli</i> TOP10
Amoxicilline	0.5-1	>512	4
Amoxicilline + CLA	0.5-1	128	4
Ticarcilline	0.5-1	>512	4
Ticarcilline + CLA	0.5-1	256	4
Pipéracilline	1.5-4	8	1
Pipéracilline + TZB	1.5-4	8	1
Céfalotine	4-8	8	2
Céfuroxime	4-8	4	2
Ceftazidime	1-4	0.12	0.06
Céfotaxime	0.75-3	0.12	0.12
Céfepime	0.25-1	0.12	0.06
Moxalactam	1-4	0.12	0.06
Aztreonam	4-8	0.12	0.12
Imipénème	0.12-0.5	0.5	0.06
Méropénème	0.12-0.5	0.5	0.06

^a CMI en $\mu\text{g/mL}$; CLA, acide clavulanique (4 $\mu\text{g/mL}$) ; TZB, tazobactam (4 $\mu\text{g/mL}$).

Tableau 8. Paramètres cinétiques de la β -lactamase OXA-134 purifiée.

Substrats	k_{cat} (s^{-1})	K_{m} (μM)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ ratio ($\text{s}^{-1}.\text{mM}^{-1}$)
Benzylpenicilline	70	50	1400
Ampicilline	150	250	600
Ticarcilline	0.2	200	1
Pipéracilline	30	200	150
Ceftazidime	-	-	-
Céfotaxime	-	-	-
Céfepime	-	-	-
Céfoxitine	-	-	-
Aztreonam	-	-	-
Imipénème	0.1	10	10
Méropénème	0.05	250	0.2

Dans chaque cas, trois expériences indépendantes ont été réalisées, la déviation standard était calculée et inférieure à 10% de la moyenne.

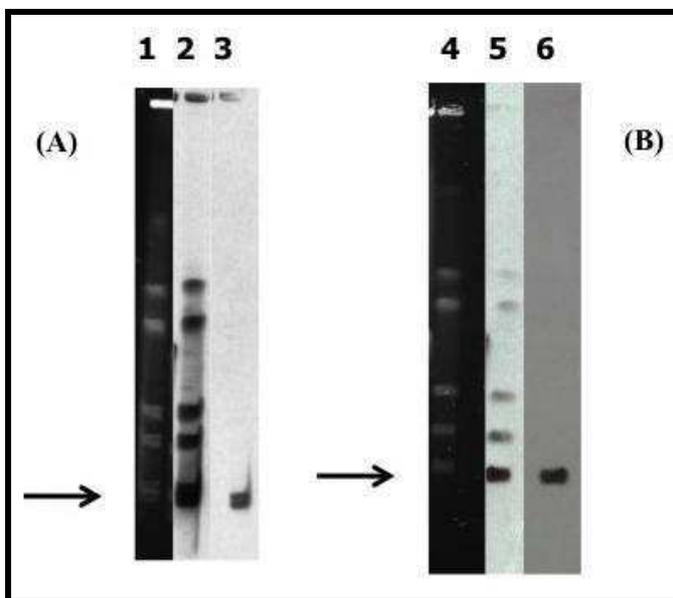
ND : hydrolyse non détectable, ($<0.01 \text{ s}^{-1}$).

4. Étude du support génétique des gènes de type $bla_{OXA-134}$ identifiés chez *A. lwoffii*

Pour déterminer la localisation chromosomique ou plasmidique des gènes de type $bla_{OXA-134}$ dans deux souches de *A. lwoffii*, nous avons utilisé la technique de restriction I-CeuI déjà décrite ci-dessus pour *A. radioresistens*. Pour les deux souches de *A. lwoffii*, un même fragment d'ADN restreint co-hybride avec les deux sondes utilisées : l'une spécifique de $bla_{OXA-134}$ et l'autre spécifique des gènes codant pour l'ARNr 16S. Ceci est en faveur d'une localisation chromosomique des gènes de type $bla_{OXA-134}$ chez *A. lwoffii* (Figure 22).

Figure 22. Identification du support du gène $bla_{OXA-134}$ dans deux souches de *A. lwoffii*.

Après extraction, l'ADN total de deux souches de *A. lwoffii* (notées A et B) a été restreint par l'endonucléase I-CeuI qui reconnaît un site au sein des gènes codant pour la sous-unité 16S de l'ARNr, localisé sur le chromosome. Une électrophorèse en champ pulsé (pistes 1 et 4) puis une hybridation avec des sondes spécifiques des gènes codant pour l'ARNr 16S (pistes 2 et 5) et de $bla_{OXA-134}$ (pistes 3 et 6) ont été réalisées. Pour les deux souches de *A. lwoffii*, un même fragment d'ADN restreint co-hybride avec les deux sondes utilisées, en faveur d'un support chromosomique des gènes de type $bla_{OXA-134}$ chez *A. lwoffii*. La flèche horizontale indique la position des hybridations avec la sonde $bla_{OXA-134}$.



5. Recherche de la diffusion éventuelle des gènes de type *bla*_{OXA-134} chez *A. baumannii*

Une collection de 100 isolats de *A. baumannii* (de sensibilités variables à l'imipénème et incluant une cinquantaine de souches résistantes aux carbapénèmes) a été testée par PCR pour évaluer si le gène *bla*_{OXA-134} avait disséminé dans cette espèce. Aucun isolat testé ne possédait un gène de type *bla*_{OXA-134}.

C : Caractérisation des oxacillinasés naturelles de *A. johnsonii*, *A. calcoaceticus* et *A. haemolyticus*: OXA-211, OXA-213 et OXA-214 (Article 3)

Nous avons identifié *A. radioresistens* et *A. lwoffii*, deux espèces proches de *A. baumannii*, comme possédant naturellement un gène codant pour une carbapénémase de type CHDL, respectivement $bla_{\text{OXA-23}}$ et $bla_{\text{OXA-134}}$. Nous avons poursuivi notre étude moléculaire au sein du genre *Acinetobacter* dans un double but :

- Identifier les réservoirs encore inconnus des autres CHDLs identifiées chez *A. baumannii* : OXA-40, OXA-58 et OXA-143.
- Identifier de nouveaux gènes codant pour des CHDLs chez d'autres espèces de *Acinetobacter*

1. Détection et caractérisation de nouveaux gènes codant pour des CHDLs au sein de souches de *Acinetobacter* spp.

Nous avons utilisé notre collection de souches appartenant au genre *Acinetobacter* avec un total de 23 espèces incluant *A. junii*, *A. johnsonii*, *A. haemolyticus*, *A. baylyi*, *A. lwoffii*/*Acinetobacter genomic species 9*, *A. radioresistens*, *A. schindleri*, *A. ursingii*, *A. calcoaceticus*, *A. gernerii*, *A. tjernbergiae*, *A. bouvetii*, *A. tandoii*, *A. grimontii*, *A. townneri*, *A. parvus* et *Acinetobacter* genomospecies 3, 6, 10, 13, 15, 16 et 17.

Les séquences protéiques complètes des CHDLs décrites chez *Acinetobacter* OXA-23, OXA-40, OXA-58, OXA-51, OXA-134 et OXA-143 ont été alignées. Des amorces dégénérées internes ont été choisies au sein des séquences nucléotidiques correspondantes aux régions pour lesquelles les séquences protéiques des différentes enzymes étaient conservées. Ces amorces dégénérées ont été nommées OXA-CHDL A et OXA-CHDL B (Tableau 17).

La PCR utilisant les amorces OXA-CHDL A et OXA-CHDL B a donné un résultat positif pour *A. baumannii*, *A. radioresistens*, *A. lwoffii*, *A. johnsonii*, *A. calcoaceticus* et *A. haemolyticus*. Après séquençage des amplicons obtenus, *A. baumannii*, *A. radioresistens* et *A. lwoffii* ont été identifiés comme possédant respectivement les gènes $bla_{\text{OXA-51}}$, $bla_{\text{OXA-23}}$ et $bla_{\text{OXA-134}}$, en accord avec les résultats présentés plus haut (parties A et B). Le séquençage des

amplicons obtenus chez *A. johnsonii*, *A. calcoaceticus* et *A. haemolyticus* a permis d'identifier 3 gènes codant pour de nouvelles β -lactamases de type D, dénommées temporairement OXA-J, OXA-C et OXA-H.

Afin de déterminer les séquences nucléotidiques flanquant les fragments internes obtenus avec les amorces OXA-CHDL A et OXA-CHDL B, les génomes complets disponibles de *A. haemolyticus* ATCC 19194 (Genbank accession number NZ_ADMT00000000.1), *A. johnsonii* SH 046 (Genbank accession number ACPL01000000) et *A. calcoaceticus* RUH 2202 (Genbank accession number ZP_06056651.1) ont été étudiés afin de détecter la présence de gènes codant pour des β -lactamases de type D. Ceux-ci ont été identifiés et des amorces externes spécifiques de chaque gène ont été construites (Tableau 17) et utilisées pour des expériences de PCR qui ont permis d'obtenir la séquence nucléotidique complète de chaque gène. Le séquençage des gènes codant pour ces β -lactamases de type D a permis de montrer que (Tableau 8) :

- **OXA-H** a été nommée **OXA-214** et présentait 53% d'identité en acides aminés avec OXA-23, 55% avec OXA-51, 53% avec OXA-40, 48% avec OXA-58.
- **OXA-J** a été nommée **OXA-211** et présentait 55% d'identité en acides aminés avec OXA-23, 58% avec OXA-51, 56% avec OXA-40, 52% avec OXA-58.
- **OXA-C** a été nommée **OXA-213** et présentait 57% d'identité en acides aminés avec OXA-23, 76% avec OXA-51, 62% avec OXA-40, 46% avec OXA-58.

Tableau 9. Caractéristiques des β -lactamases OXA-211, OXA213 et OXA-214.

	β-lactamases		
	OXA-211	OXA-213	OXA-214
Hôte bactérien	<i>A. johnsonii</i>	<i>A. calcoaceticus</i>	<i>A. haemolyticus</i>
% d'identité avec OXA-51	58	76	55
% d'identité avec OXA-23	55	57	53
% d'identité avec OXA-40	56	62	53
% d'identité avec OXA-58	52	46	48

OXA-211, OXA-213 et OXA-214 présentaient les caractéristiques classiques des β -lactamases de classe D, notamment la tétrade S-T-F-K en position DBL 70 à 73 (Figure 23). En outre, OXA-213 et OXA-214 présentait un motif FGN aux positions DBL 144 à 146 au lieu du motif habituel YGN des β -lactamases de classe D, comme observé pour les autres CHDLs (sauf OXA-58 et OXA-51). Pour les trois nouvelles enzymes, un motif KSG était identifié aux positions DBL 216 à 218, alors que le motif KTG est habituellement présent à cette position pour la plupart des β -lactamases de classe D, y compris la CHDL OXA-23.

```

OXA-211    ---MKTQLALIALITTFGSACTTIPPSVETAKNHQQQSAQQQIQQAFDQLQTTGVIVIK
OXA-213    ---MYKKALIVATSILFLSACSSNMVKQHQIHSIS-ANKNSEEIKSLFDQAQTGVLVIK
OXA-214    --MKLSKLYTLTVLIGFGLSGVACQHIHTPVSEFNQIENDQTKQIASLFFENVQTTGVLTTF
OXA-51     ---MNIKTLTLLITSAIFISACSPYIVTANPNHSASKSDEKAEKIKNLFNEVHTTGVLVIIQ
OXA-40     -MKKFILPIFISISILVLSLACSISIKTKSEDNFHS-SQQHEKAIKSYFDEAQTQGVIIK
OXA-23     ---MNKYFTCYVVASLFLSGCTVQHNLIN-ETPSQIVQGHNVQIHQYFDEKNTSGVLVIQ
OXA-58     MKLLKILSLVCLISISIGACAEHMSRAKTSTIPQVNNSIIDQNVQALFNEISADAVFVTY

              70  73
              |  |
OXA-211     DKHGLHSYGNLDSRAQTPYVPASTFKMLNALIGLEHGKATSTEVFKWDGQKRSFPAWEKD
OXA-213     RGQTEEIYGNDFKRASTDYVPASTFKMLNALIGLEHHKATTEVFVKWNGQKRLFDPWEKD
OXA-214     DGQAYKAYGNLDRAKTAYIPASTFKILNALIGIEHDKTSPNEVFKWDGQKRAFESWEKD
OXA-51      QGQTQQSYGNLDRARASTEYVPASTFKMLNALIGLEHHKATTEVFVKWDGQKRLFPEWEKD
OXA-40      EGKNLSTYGNALARANKEYVPASTFKMLNALIGLENHKATNEIFKWDGKRRYPMWEKD
OXA-23      TDKKINLYGNALSRASTEYVPASTFKMLNALIGLENQKTDINEIFKWKGEKRSFTAWEKD
OXA-58      DGQNIKKYGTHLDRAKTAYIPASTFKIANALIGLENHKATSTEIFKWDGKPRFFKAWDKD
              * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
              144  146
              |  |
OXA-211     MTLGQAMQASAVPVYQELARRIGLDLMSKEVQRIGYGNQQIGTVVDNFWLVGPLQITPVQ
OXA-213     MTLGDAMKASAIIPVYQELARRIGLDLMSKEVQRVGFGNANIGSKVDNFWLVGPLKITPQQ
OXA-214     LTLAEAMQASAVPVYQALAQRIGLDLMAKEVKRVGFGNTRIGTQVDNFWLVGPLKITPIE
OXA-51      MTLGDAMKASAIIPVYQDLARRIGLELMSKEVQRVGYGNADIGTQVDNFWLVGPLKITPQQ
OXA-40      MTLGEAMALSAPVYQELARRTGLELMQKEVKRVNFGNTNIGTQVDNFWLVGPLKITPVQ
OXA-23      MTLGEAMKLSAVPVYQELARRIGLDLMSKEVQRIGFGNAEIGQQVDNFWLVGPLKVTPIQ
OXA-58      FTLGEAMQASTVPVYQELARRIGPSLMQSELQRIGYGNMQIGTEVDQFVLKGPLTITPIQ
              ** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
              216  218
              |  |
OXA-211     EVLFVEKLANTQLAFKPDVQHTVQDMLLIEQKPNYKLYAKSGWGM DLEPQVGWWTGWVET
OXA-213     ETQFAYQLAHTLPLFSKDVQEQVQSMVFIEEKNGSKIYAKSGWGDVPEPQVGWLTGWVVQ
OXA-214     EAQFAYRLAKQELPFTPKTQQQVIDMLLVDEIRGTKVYAKSGWMDITPQVGWWTGWIED
OXA-51      EAQFAYKLANKTLPFSQVQDEVSMLFIEKNGNKIYAKSGWGDVDPQVGWLTGWVVQ
OXA-40      EVNFADDLAHNRLPFKLETQEEVKKMLLIKEVNGSKIYAKSGWGMGVTTPQVGWLTGWVEQ
OXA-23      EVEFVSQLAHTQLPFSEKVVQANVKNMLLLEESNGYKIFGKTGWAMDIKPQVGWLTGWVEQ
OXA-58      EVKFVYDLAQQLPFKPEVQQVKEMLYVERRGENRLYAKSGWMAVDPQVGWVYGFVEK
              * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

OXA-211     ATSEKVFALNMHMKTGISASVREQLVKQSLTALGII---
OXA-213     PQGEIVAFSLNLEMKKGTPSSIRKEIAYKGLEQLGIL---
OXA-214     PNGKVI AFSLNMEMNQPAHAAARKEIVYQALTQLKLL---
OXA-51      PQGNIVAFSLNLEMKKGIPSSVRKEITYKSLEQLGIL---
OXA-40      ANGKKIPFSLNLEMKEGMSGIRNEITYKSLENLGI---
OXA-23      PDGKIVAFALNMEMRSEMPASIRNELLMKSLKQLNII---
OXA-58      ADGQVAFALNMQMKAGDDIALRKQLSLDVLDKLGVFHYL
              * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Figure 23. Aligement des acides aminés des β -lactamases de classe D OXA-211, OXA-213 et OXA-214 identifiées respectivement chez *A. johnsonii*, *A. calcoaceticus* et *A. haemolyticus* avec les séquences de OXA-23, OXA-40, OXA-58 et OXA-51.

Les motifs conservés des β -lactamases (même avec des différences mineures) sont indiqués en gris. La numérotation correspond à la numérotation des enzymes de classe D (Couture et coll. 1992).

L'analyse phylogénétique montre que OXA-211, OXA-213 et OXA-214 constituent des sous-groupes de CHDLs à part entière, mais plus proche des CHDLs identifiées chez *Acinetobacter* spp. que des autres CHDLs (Figure 24).

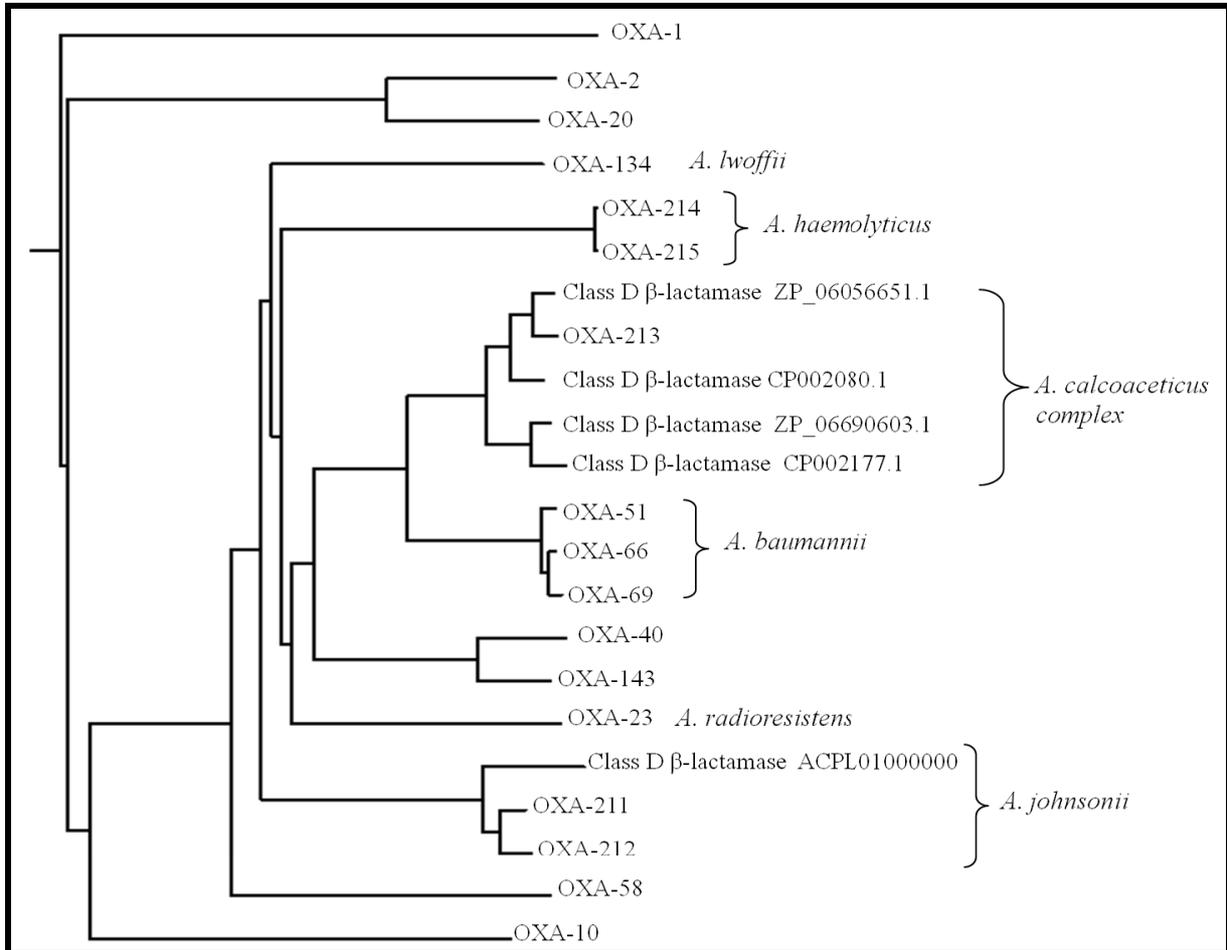


Figure 24. Dendrogramme obtenu pour 22 β-lactamases de classe D.

Le dendrogramme a été élaboré par la méthode phylogénétique de « neighbor joining ». La longueur des branches est proportionnelle au nombre de changements d'acides aminés. La distance le long de l'axe vertical n'est pas significative. Les β-lactamases de classe D considérées comme naturellement présentes sont indiquées à côté de l'espèce bactérienne qui les possède.

2. Distribution des gènes de type *bla*_{OXA-211} chez *A. johnsonii*, *bla*_{OXA-213} chez *A. calcoaceticus* et *bla*_{OXA-214} chez *A. haemolyticus*

Dans le but d'évaluer si les gènes de type *bla*_{OXA-211}, *bla*_{OXA-213} et *bla*_{OXA-214} étaient naturellement présents respectivement chez *A. johnsonii*, *A. calcoaceticus* et *A. haemolyticus*, nous avons recherché la présence de ces gènes dans des souches cliniques d'une part et dans les génomes complets de ces espèces disponibles sur Genbank d'autre part.

▪ Distribution au sein de souches cliniques

Des expériences de PCR utilisant des amorces spécifiques des gènes de type *bla*_{OXA-211}, *bla*_{OXA-213} et *bla*_{OXA-214} ont été réalisées respectivement pour 2 souches de *A. johnsonii*, une souche de *A. calcoaceticus* et 2 souches de *A. haemolyticus*.

▪ Distribution au sein de génomes complets séquencés disponibles dans les banques de données Genbank

- Les gènes de type *bla*_{OXA-211} ont été recherchés et identifiés pour le génome disponible de *A. johnsonii* (Genbank accession number ACPL01000000).

- Les gènes de type *bla*_{OXA-213} ont été recherchés et identifiés dans les 4 génomes disponibles de *A. calcoaceticus* (*A. calcoaceticus* RUH2202 Genbank accession number ZP_06056651.1, *A. calcoaceticus* DR1 Genbank accession number CP002080.1, *A. calcoaceticus* PHEA-2 Genbank accession number CP002177.1 et *Acinetobacter* sp. SH024 Genbank accession number ZP_06690603.1).

- Les gènes de type *bla*_{OXA-214} ont été recherchés et identifiés dans le génome disponible de *A. haemolyticus* (Genbank accession number NZ_ADMT00000000.1).

Au total, 3 variants de OXA-211, 5 variants de OXA-213 et 3 variants de OXA-214 ont ainsi été identifiés.

3. Étude de l'expression des gènes de type *bla*_{OXA-211} chez *A. johnsonii*, *bla*_{OXA-213} chez *A. calcoaceticus* et *bla*_{OXA-214} chez *A. haemolyticus*

Toutes les souches cliniques étudiées de *A. calcoaceticus*, *A. haemolyticus* et *A. johnsonii* étaient sensibles à tous les antibiotiques testés, y compris les pénicillines et les carbapénèmes (Tableau 8). Il est donc probable que les gènes *bla*_{OXA-211}, *bla*_{OXA-213} et *bla*_{OXA-214} ne soient pas exprimés (ou à un très faible niveau) chez leurs hôtes respectifs.

Tableau 10. CMI des β -lactamines pour les souches représentatives de différentes espèces de *Acinetobacter* et des souches recombinantes.

β -lactamines	CMI ($\mu\text{g/mL}$)							
	<i>A. johnsonii</i> CIP 70.16	<i>A. calcoaceticus</i> CIP 81.8	<i>A. haemolyticus</i> VAL	<i>E. coli</i> TOP10 (pTOPO-OXA-211)	<i>E. coli</i> TOP10 (pTOPO-OXA-213)	<i>E. coli</i> TOP10 (pTOPO-OXA-214)	<i>E. coli</i> TOP10 (pTOPO-OXA-23)	<i>E. coli</i> TOP10
Amoxicilline	8	2	8	256	48	256	>256	2
Amoxicilline+ CLA	4	1	2	128	48	128	256	2
Ticarcilline	4	2	1	128	48	128	>256	2
Ticarcilline + CLA	2	1	0.5	128	48	128	128	2
Pipéracilline	64	1	6	6	6	8	16	1
Pipéracilline + TZP	16	1	2	4	4	4	8	1
Céfotaxime	32	0.12	4	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06
Ceftazidime	8	0.12	2	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12
Céfepime	8	0.12	1	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06
Aztreonam	64	2	4	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
Méropénème	0.19	0.03	0.25	0.03	0.032	0.06	0.09	0.02
Doripénème	0.12	0.06	0.12	0.03	0.032	0.06	0.06	0.02
Imipénème	0.12	0.12	0.12	0.25	0.25	0.12	1	0.12
Ertapénème	3	0.06	1	0.06	0.06	0.12	0.12	0.06

CLA, acide clavulanique (4 $\mu\text{g/ml}$). TZP, tazobactam (4 $\mu\text{g/ml}$)

4. Expression comparée des gènes *bla*_{OXA-211}, *bla*_{OXA-213} et *bla*_{OXA-214} et activités enzymatiques comparées de OXA-211, OXA-213 et OXA-214

Afin d'étudier les propriétés biochimiques de OXA-211, OXA-213 et OXA-214, les gènes correspondants ont été clonés dans le vecteur recombinant pCR-BluntII-TOPO et exprimés chez *E. coli* TOP10. Les souches recombinantes *E. coli* TOP10 pOXA-211, *E. coli* TOP10 pOXA-213 et *E. coli* TOP10 pOXA-214 ont montré un phénotype identique d'oxacilline à activité de carbapénémase quel que soit le gène considéré. Nous avons observé une réduction de la sensibilité à l'imipénème et au méropénème, et une résistance aux pénicillines qui n'est pas inhibée par les inhibiteurs des β -lactamases. Ces résultats sont résumés dans le tableau 9.

Tableau 11. Activités enzymatiques spécifiques comparées de OXA-211 de *A. johnsonii*, OXA-213 de *A. calcoaceticus*, OXA-214 de *A. haemolyticus* et de OXA-51 de *A. baumannii* et OXA-23 de *A. radioresistens* (utilisées comme référence) exprimées chez *E. coli* TOP10.

Substrate (100 μ M)	Activités spécifiques (mU/mg) ^a				
	OXA-51	OXA-213	OXA-214	OXA-211	OXA-23
Benzylpenicillin	100	440	187	169	854
Cefotaxime	- ^b	-	-	-	-
Ceftazidime	-	-	-	-	-
Aztreonam	-	-	-	-	-
Imipenem	0.4	3	2	3	4.5
Meropenem	0.4	0.1	-	0.1	1
Ertapenem	-	2	1.5	0.35	1

^a Dans chaque cas, trois expériences indépendantes ont été réalisées, la déviation standard étant inférieure à 10% de la moyenne.

^b (-): pas d'hydrolyse détectable

5. Étude du support génétique des gènes *bla*_{OXA-211}, *bla*_{OXA-213} et *bla*_{OXA-214}

L'analyse des génomes complets séquencés disponibles a montré que le support génétique des gènes *bla*_{OXA-211}, *bla*_{OXA-213} et *bla*_{OXA-214} était chromosomique respectivement chez *A. johnsonii*, *A. calcoaceticus* et *A. haemolyticus*.

D : Sélection *in vivo* d'une souche de *A. baumannii* de sensibilité diminuée aux carbapénèmes médiée par la surexpression du gène codant pour l'oxacillinase naturelle de *A. baumannii* OXA-66 (Article 4)

Nous rapportons ici les données cliniques, microbiologiques et moléculaires en rapport avec l'isolement de deux souches isogéniques de *A. baumannii* chez un même patient au cours de son hospitalisation : la première était sensible aux carbapénèmes et la seconde présentait une réduction de sensibilité aux carbapénèmes.

1. Patient et souches.

La souche de *A. baumannii* A1 sensible aux carbapénèmes a été isolée à partir d'écouvillons rectaux et de plaies d'un patient de 62 ans hospitalisé en réanimation pour prise en charge d'un polytraumatisme au CHU de Grenoble en juin 2007. Après trois semaines de traitement par imipénème (500mg trois fois par jour, associé à ciprofloxacine et linezolide), la souche de *A. baumannii* A2 présentant un niveau de sensibilité intermédiaire à l'imipénème a été isolée à partir d'une aspiration trachéale. Pendant les mois qui ont suivi, une épidémie d'infections et de colonisations à *A. baumannii* A1 est survenue à l'hôpital de Grenoble impliquant 36 patients (8 infections et 28 colonisations).

2. Profils de résistance aux antibiotiques des souches de *A. baumannii* A1 et A2

Les antibiogrammes des deux souches A1 et A2 sont présentés sur la figure 25. La souche A1 était sensible uniquement à l'imipénème, au méropénème, à la colistine et résistante à tous les autres antibiotiques. La souche A2 présentait le même profil de résistance que la souche A1 avec, en plus, une diminution de la sensibilité à l'imipénème et au méropénème (Tableau 11). Des tests de sensibilité aux antibiotiques, notamment à la ceftazidime et au céfépime, ont été réalisés sur des boîtes contenant de la cloxacilline (inhibant la céphalosporinase chromosomique AmpC). La restauration d'une sensibilité aux antibiotiques testés indique une probable surexpression de cette céphalosporinase chromosomique.

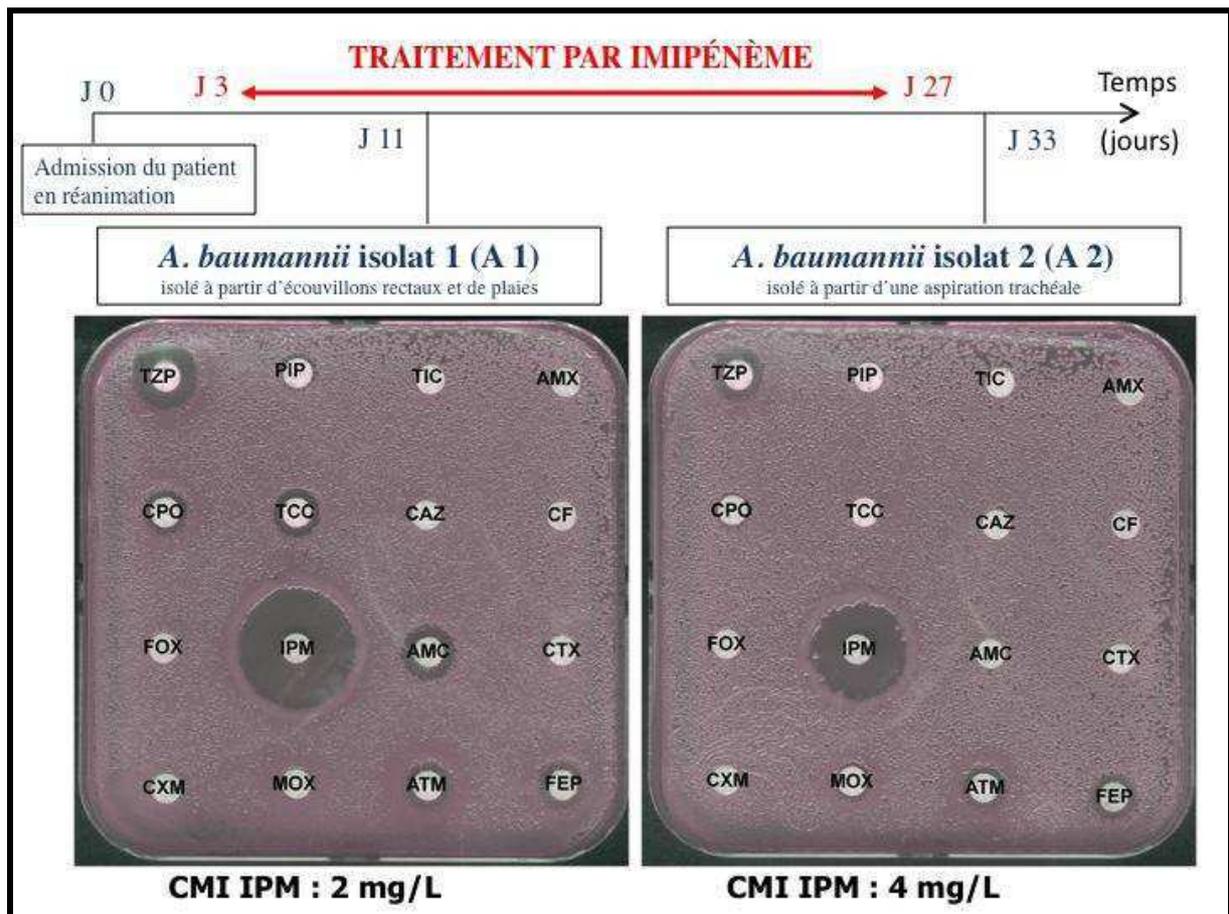


Figure 25. Schéma représentant les deux isolats de *A. baumannii* identifiés chez un patient pendant son hospitalisation en réanimation.

3. Investigations moléculaires

Une électrophorèse en champ pulsé a permis de montrer que les deux souches de *A. baumannii* étaient clonalement reliées (Figure 26).

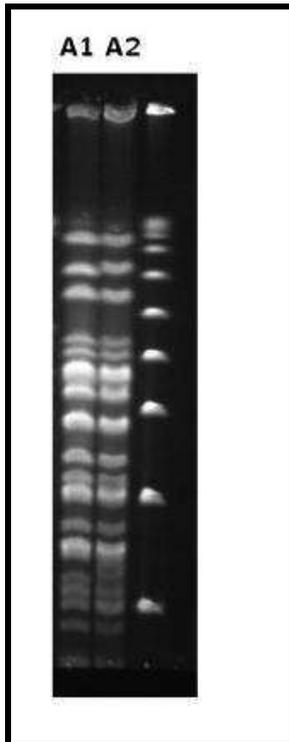


Figure 26. Génotypage des deux souches de *A. baumannii* A1 et A2 par électrophorèse en champ pulsé après restriction par l'enzyme *ApaI*.

Par PCR, le contenu en β -lactamases des deux souches a été déterminé (Tableau 10) :

- les deux souches A1 et A2 possédaient le gène *bla*_{TEM-1}, codant pour une pénicillinase à spectre étroit et probablement à l'origine de la résistance à la ticarcilline observée dans les deux souches
- les deux souches A1 et A2 possédaient *ISAbal* localisé 9 paires de base en amont de *bla*_{ADC}, confirmant la surexpression de la céphalosporinase chromosomique AmpC
- aucune des deux souches ne possédait un gène codant pour une CHDL acquise (OXA-40, OXA-58 ou OXA-23)
- les deux souches A1 et A2 possédaient le gène *bla*_{OXA-66}, correspondant au gène naturel de type *bla*_{OXA-51}
- la séquence d'insertion *ISAbal*, présente dans les génomes des deux souches A1 et A2, n'a pas été identifiée en amont du gène *bla*_{OXA-66} de la souche A1 alors qu'elle a été identifiée 7 pb en amont de ce gène dans la souche A2

Tableau 12. Analyse moléculaire du contenu en gènes de β -lactamases et en séquences d'insertion au sein des deux souches de *A. baumannii* A1 et A2.

Gènes détectés par PCR	Isolat A1	Isolat A2
Gènes de type <i>bla</i> _{OXA-51}	Positive : gène <i>bla</i> _{OXA-66}	Positive : gène <i>bla</i> _{OXA-66}
Gènes de type <i>bla</i> _{OXA-23}	Négative	Négative
Gènes de type <i>bla</i> _{OXA-40}	Négative	Négative
Gènes de type <i>bla</i> _{OXA-58}	Négative	Négative
<i>ISAbal</i>	Positive	Positive
<i>ISAbal</i> en amont du gène de type <i>bla</i> _{OXA-51}	Négative	Positive
Gènes de type <i>bla</i> _{TEM}	Positive : <i>bla</i> _{TEM-1} gene	Positive : <i>bla</i> _{TEM-1} gene
Gènes de type <i>bla</i> _{SHV}	Négative	Négative
Gène <i>bla</i> _{ADC}	Positive	Positive
<i>ISAbal</i> en amont du gène <i>bla</i> _{ADC}	Positive	Positive

ADC : *Acinetobacter*-derived cephalosporinase.

4. Rôle de la structure *ISAbal-bla*_{OXA-66}

a. Étude transcriptionnelle quantitative par RT-PCR

Dans le but d'étudier le possible rôle de la structure *ISAbal-bla*_{OXA-66} dans la diminution de la sensibilité aux carbapénèmes, une expérience de RT-PCR quantitative a été réalisée pour mesurer l'expression du gène *bla*_{OXA-66}. L'analyse des profils transcriptionnels a montré que l'expression de ce gène était 50 fois plus élevée dans la souche A2, comportant *ISAbal* en amont de *bla*_{OXA-66} par rapport à celle observée pour la souche A1, comportant *bla*_{OXA-66} seul.

b. Inactivation du gène *bla*_{OXA-66} dans la souche de *A. baumannii* A2

L'insertion du plasmide pACYC184-RA-OXA-66 dans la souche *A. baumannii* A2 a permis la construction d'un mutant « knock-out » pour le gène *bla*_{OXA-66}. L'inactivation du gène *bla*_{OXA-66} a conduit à une sensibilité aux carbapénèmes augmentée pour la souche *A. baumannii* A2 (Δ OXA-66) en comparaison aux souches A1 et A2 de *A. baumannii* (Tableau 11).

Tableau 13. CMI de certains antibiotiques pour les souches de *A. baumannii* A1, A2 et le mutant A2 dont le gène *bla_{OXA-66}* a été inactivé A2 (Δ OXA-66).

Antibiotique	CMI (μ g/ml)		
	A1	A2	A2 (Δ OXA-66)
Imipénème	2	4	0.5
Méropénème	3	6	0.5
Rifampicine	8	8	128
Ceftazidime	128	128	128

E : Caractérisation de IS*Aba9*, une nouvelle séquence d'insertion à l'origine de la surexpression du gène naturel *bla*_{OXA-51} de *A. baumannii* (Article 5)

Nous avons vu que la présence de la séquence d'insertion IS*Aba1* en amont du gène naturel de *A. baumannii* *bla*_{OXA-51}, peut apporter des séquences promotrices permettant la surexpression de ce gène et diminuer la sensibilité aux carbapénèmes de *A. baumannii*. L'étude d'une collection de souches de *Acinetobacter* spp. provenant de Grèce et résistantes aux carbapénèmes a conduit à la caractérisation de IS*Aba9*, une nouvelle séquence d'insertion à l'origine de la surexpression du gène naturel *bla*_{OXA-51} de *A. baumannii*.

1. Caractérisation des souches de *Acinetobacter* spp. provenant de Grèce

Entre Août 2001 et Novembre 2006, une collection de souches de *Acinetobacter* spp. résistantes aux carbapénèmes a été constituée à l'hôpital Papageorgiou de Thessaloniki, Grèce. Parmi les 20 isolats différents de *A. baumannii* résistants aux carbapénèmes, 20 étaient résistants à l'imipénème seul et 8 résistants en plus au méropénème (Tableau 12). Aucune métallo-β-lactamase n'a été détectée par les bandelettes E-test contenant de l'EDTA. Une électrophorèse en champ pulsé (PFGE) a permis de montrer 5 profils PFGE différents, définissant 5 clones différents nommés clone I à clone V (Tableau 12).

Tableau 14. Caractérisation des souches de *A. baumannii* isolés à Thessaloniki, Grèce.

No.	Profil PFGE	Date d'isolement (mo/j/an)	Service	CMI (µg/ml)		Source	Gène de type <i>bla</i> _{OXA-51}	Présence ou absence de :				
				IMP	MP			<i>bla</i> _{OXA-58}	<i>ISAbal</i>	<i>ISAbal</i> en amont de <i>bla</i> _{OXA-51}	<i>ISAbal</i> en amont de <i>bla</i> _{OXA-51}	<i>ISAbal</i> en amont de <i>bla</i> _{OXA-51}
Ab2	V	08/20/02	Réanimation	4	2	écouvillon	<i>bla</i> _{OXA-51}	-	+	+	+	-
Ab5	V	09/20/01	Réanimation	64	64		<i>bla</i> _{OXA-51}	-	+	+	+	+
Ab23	V	06/22/04	Chirurgie cardiaque	64	32		<i>bla</i> _{OXA-51}	-	+	+	+	-
Ab3	IV	12/13/02	Réanimation	8	16		<i>bla</i> _{OXA-66}	-	-	-	+	-
Ab11	III	09/16/03	Réanimation	64	16		<i>bla</i> _{OXA-64}	+	+	-	-	-
Ab133	III	12/10/05	Chirurgie cardiaque	8	4		<i>bla</i> _{OXA-64}	+	+	-	-	-
Ab150	III	03/19/06	Chirurgie plastique	16	4		<i>bla</i> _{OXA-64}	+	+	-	-	-
Ab168	III	10/21/06	Réanimation	12	4		<i>bla</i> _{OXA-64}	+	+	-	-	-
Ab12	II	09/29/03	Réanimation	64	16		<i>bla</i> _{OXA-66}	+	-	-	-	-
Ab30	II	02/24/04	Réanimation	64	16		<i>bla</i> _{OXA-66}	+	-	-	-	-

No.	Profil PFGE	Date d'isolement (mo/j/an)	Service	CMI (µg/ml)		Source	Gène de type <i>bla</i> _{OXA-51}	Présence ou absence de :					
				IMP	MP			<i>bla</i> _{OXA-58}	<i>ISAbal</i>	<i>ISAbal</i> en amont de <i>bla</i> _{OXA-51}	<i>ISAbal</i> en de	<i>ISAbal9</i>	<i>ISAbal9</i> en amont de <i>bla</i> _{OXA-51}
Ab58	II	01/11/05	Neurologie	16	8		<i>bla</i> _{OXA-66}	+	-	-	-	-	-
Ab177	II	11/07/06	Séjour externe	8	4		<i>bla</i> _{OXA-66}	+	-	-	-	-	-
Ab33	II	10/21/04	Chirurgie cardiaque	64	16		<i>bla</i> _{OXA-66}	+	-	-	-	-	-
Ab63	II	11/02/04	Chirurgie 1	16	8		<i>bla</i> _{OXA-66}	+	-	-	-	-	-
Ab91	II	05/28/05	Réanimation	16	4		<i>bla</i> _{OXA-66}	+	-	-	-	-	-
Ab153	II	04/20/06	Réanimation	16	4		<i>bla</i> _{OXA-66}	+	-	-	-	-	-
Ab185	II	11/23/06	Neurochirurgie	24	8		<i>bla</i> _{OXA-66}	+	-	-	-	-	-
Ab108	I	09/04/05	Chirurgie cardiaque	16	4		<i>bla</i> _{OXA-92}	+	-	-	-	-	-
Ab114	I	09/23/05	Court séjour	16	6		<i>bla</i> _{OXA-92}	+	-	-	-	-	-
Ab181	I	11/15/06	Chirurgie cardiaque	32	6		<i>bla</i> _{OXA-92}	+	-	-	-	-	-

Tableau 14 (suite). Caractérisation des souches de *A. baumannii* isolés à Thessaloniki, Grèce.

2. Analyse moléculaire

Tous les résultats sont présentés dans le Tableau 12.

- La PCR utilisant des amorces spécifiques des gènes de type *bla*_{OXA-51} a été positive pour les 20 isolats de *A. baumannii* testés.
- Les PCRs utilisant des amorces spécifiques des gènes de type *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-40} et *bla*_{OXA-58} ont montré que 16 isolats appartenant aux clones I, II et III possédaient le gène *bla*_{OXA-58} alors qu'aucun isolat ne possédait un gène de type *bla*_{OXA-23} ou *bla*_{OXA-40}.
- *ISAbal* a été identifiée par PCR dans les souches appartenant aux clones III et V.
- Dans trois isolats clonalement reliés, Ab2, Ab5 et Ab23, *ISAbal* a été identifiée en amont du gène *bla*_{OXA-51}. Dans l'isolat Ab5, la copie de *ISAbal* située immédiatement en amont du gène *bla*_{OXA-51} était tronquée par une nouvelle séquence d'insertion nommée *ISAbal9* (Figure 27).

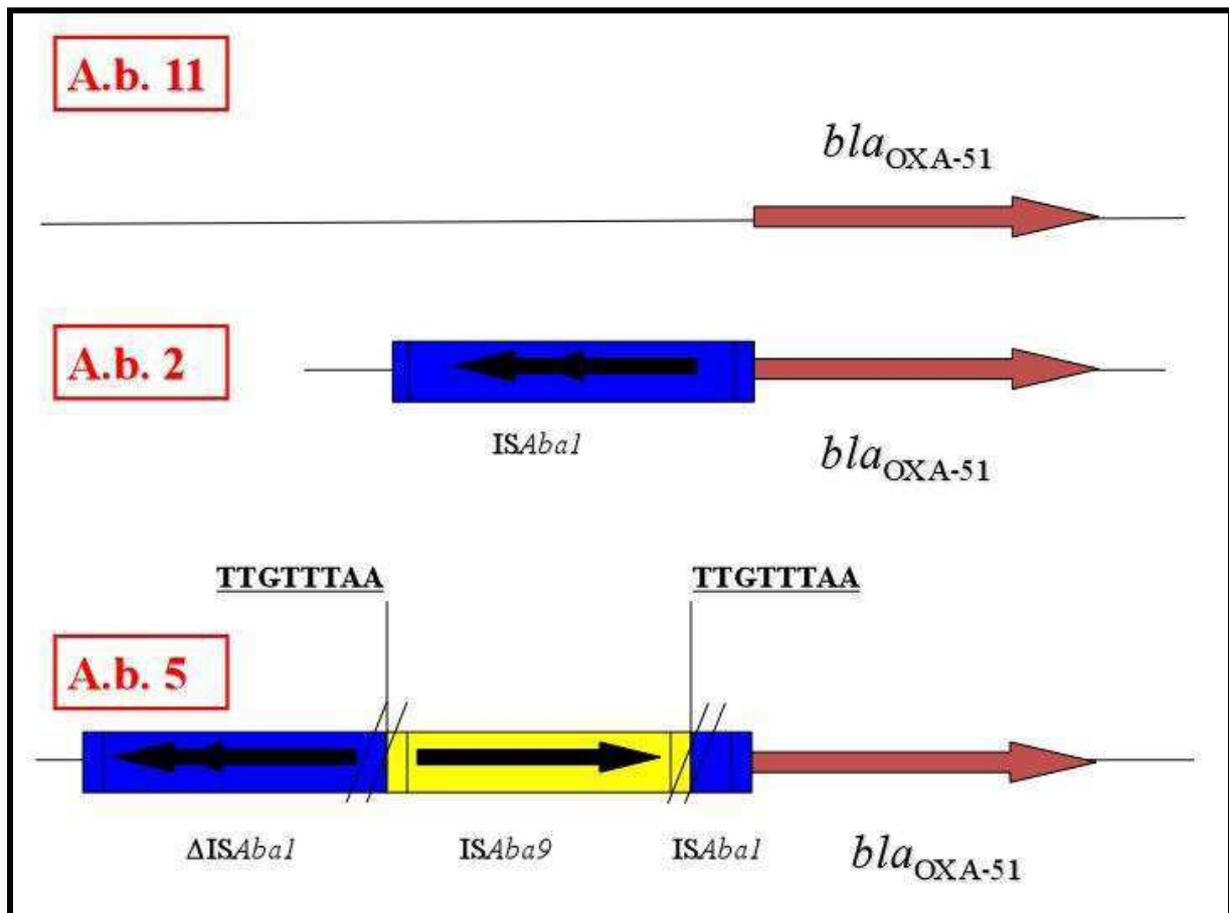


Figure 27. Environnement génétique du gène *bla*_{OXA-51} dans 3 souches différentes de *A. baumannii* isolées en Grèce.

3. Caractérisation et distribution de ISAb_a9

ISAb_a9 est une séquence d'insertion de 974 pb appartenant à la famille IS982 (<http://www-is.biotoul.fr/>). Elle possède des séquences inversées répétées de 17 pb et était entourée d'une duplication du site d'insertion de 8 pb (TTGTTTAA), probable signature d'un événement de transposition.

La distribution de ISAb_a9 dans cette collection de 20 souches de *A. baumannii* a été étudiée par PCR en utilisant des amorces spécifiques. Quatre souches possédaient cette séquence d'insertion : Ab2, Ab3, AB5 et Ab23. Seule Ab5 présentait ISAb_a9 en amont du gène de type *bla*_{OXA-51} (Tableau 12).

4. Étude du rôle de ISAb_a9 dans l'expression du gène *bla*_{OXA-51}

Nous avons émis l'hypothèse que la présence de ISAb_a9 au sein de ISAb_a1 en amont du gène *bla*_{OXA-51} dans l'isolat Ab5 pouvait contribuer à la résistance aux carbapénèmes en apportant des séquences promotrices conduisant à une surexpression de ce gène.

Tout d'abord, la souche Ab2 possédant ISAb_a1 seule en amont de *bla*_{OXA-51} présentait une CMI d'imipénème et de méropénème respectivement à 4 et 2 µg/ml alors que la souche isogénique Ab5, qui possédait ISAb_a1 tronquée par ISAb_a9 en amont de *bla*_{OXA-51} possédait une CMI d'imipénème et de méropénème à 64 µg/ml.

L'analyse de l'environnement génétique du gène *bla*_{OXA-51} chez Ab5 a montré que ISAb_a1 apportait des séquences promotrices en -35 et -10, comme déjà décrit. De plus, un promoteur hybride constitué par une boîte -35 située dans ISAb_a9 et une boîte -10 située dans ISAb_a1 avec un espace optimal de 17 pb entre les boîtes -35 et -10 a été identifié (Figure 28).

Des expériences de RT-PCR ont été réalisées afin de quantifier l'expression du gène *bla*_{OXA-51} dans chacune des deux souches clonalement reliées Ab2 et Ab5. L'analyse transcriptionnelle a montré une expression du gène *bla*_{OXA-51} huit fois supérieure (moyenne ± écart-type : 8 ± 5) avec la structure génétique comprenant ISAb_a9 et ISAb_a1 en comparaison avec ISAb_a1 seule et en prenant le gène codant pour l'ARNr16S comme référence.

Figure 28A. Séquence nucléotidique des régions promotrices putatives -35 et -10 au sein de ISAbal décrite dans la souche Ab2. La séquence inversée répétée gauche (IRL) de ISAbal est surlignée en gris. Les séquences putatives -35 et -10 sont surlignées en jaune.

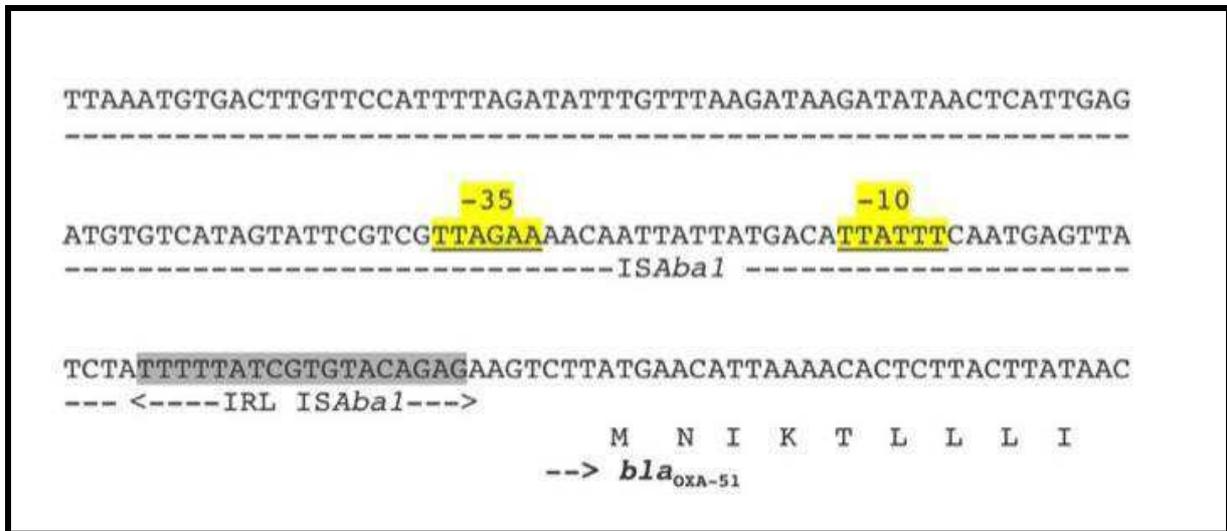
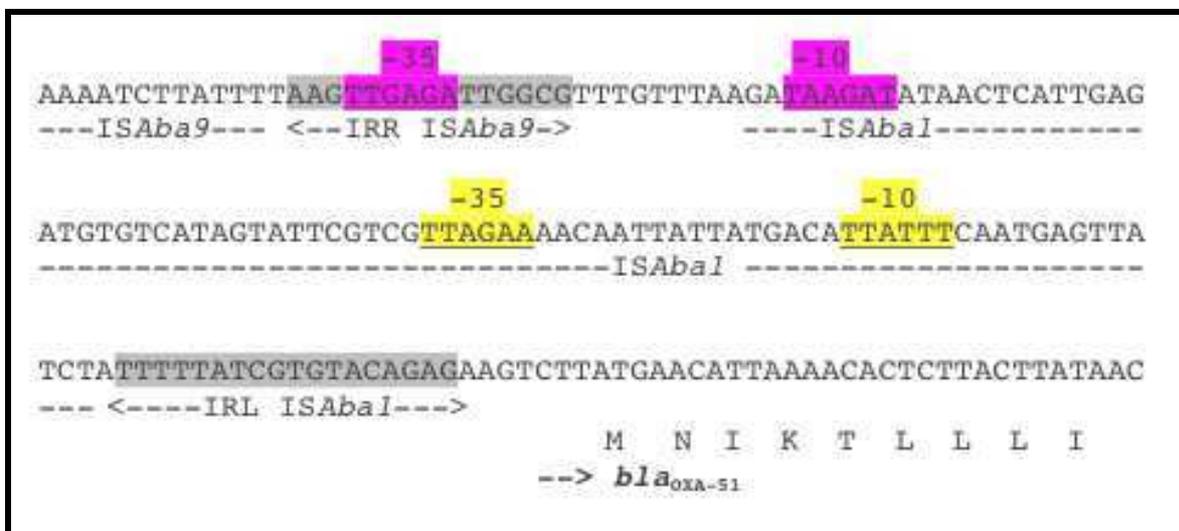


Figure 28B. Séquence nucléotidique des régions promotrices putatives -35 et -10 au sein de ISAbal décrite dans la souche Ab5. La séquence inversée répétée gauche (IRL) de ISAbal et la séquence inversée répétée droite (IRR) de ISAbal9 sont surlignées en gris. Les séquences putatives -35 et -10 sont surlignées en jaune et en violet.

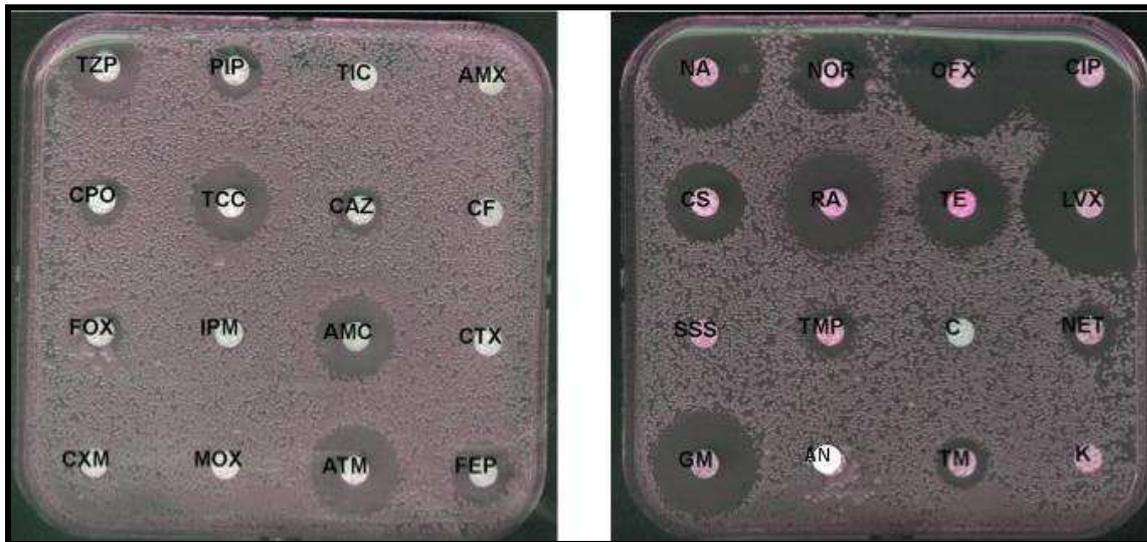


F : Identification de la métallo- β -lactamase VIM-4 chez *Acinetobacter* spp. (Article 6)

1. Caractérisation de la souche bactérienne de *Acinetobacter* spp. A154

Une souche de *Acinetobacter* spp. dénommée A154 a été isolée à partir de l'expectoration d'un patient âgé de 80 ans hospitalisé en service de médecine interne à l'hôpital Papageorgiou de Thessaloniki, Grèce. Cet isolat était résistant à la ceftazidime (CMI 256 $\mu\text{g/ml}$), à l'imipénème (CMI 32 $\mu\text{g/ml}$) et au méropénème (CMI 32 $\mu\text{g/ml}$) et était sensible à amoxicilline + acide clavulanique, ticarcilline + acide clavulanique et à l'aztréonam. De plus, A154 était résistant au chloramphénicol, aux sulfamides, à l'amikacine et à la kanamycine et sensible à la gentamicine, à l'acide nalidixique et aux fluoroquinolones, à la rifampicine et aux tétracyclines (antibiogramme présenté en Figure 29). Pour cette souche, la détection d'une métallo- β -lactamase par les bandelettes E-test contenant de l'EDTA a été positive (Figure 30).

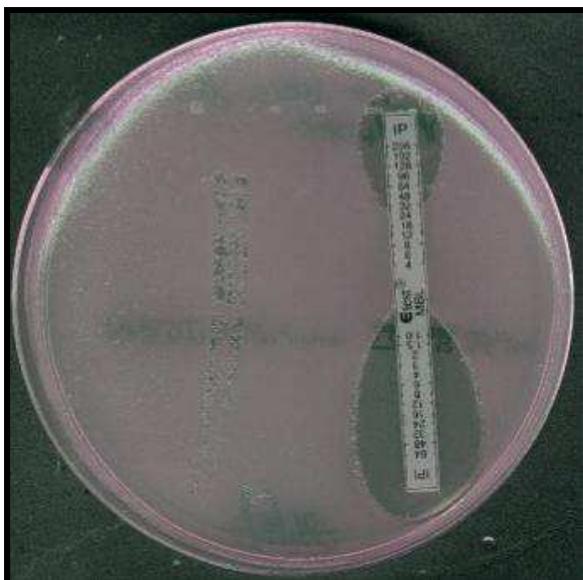
Figure 29. Antibiogramme de la souche de *Acinetobacter* spp. A154.



Les abréviations utilisées sont les suivantes :

TZP : pipéracilline + tazobactam ; PIP : pipéracilline ; TIC : ticarcilline ; AMX : amoxicilline ; CPO : cefpirome ; TCC : ticarcilline + acide clavulanique ; CAZ : ceftazidime ; CF : cefalotine ; FOX : cefoxitine ; IPM : imipénème ; AMC : amoxicilline + acide clavulanique ; CTX : cefotaxime ; CXM : cefuroxime ; K : kanamycine ; ATM : aztréonam ; FEP : cefepime ; NA : acide nalidixique ; NOR : norfloxacine ; OFX : ofloxacine ; CIP : ciprofloxacine ; CS : colistine ; RA : rifampicine ; TE : tétracycline ; LVX : levofloxacine ; S : streptomycine ; TMP : triméthoprim ; C : chloramphénicol ; NET : netilmicine ; GM : gentamicine ; AN : amikacine ; TM : tobramycine ; MOX : moxalactam

Figure 30. CMI d'imipénème avec et sans EDTA pour la détection de métallo- β -lactamase dans la souche de *Acinetobacter* spp. A154.



2. Analyse moléculaire de la souche bactérienne *Acinetobacter* spp. A154

a. Identification d'espèce

L'identification d'espèce de l'isolat A154 en utilisant une approche génotypique par analyse des gènes codant pour l'ARNr16S a montré que celui-ci appartenait à l'espèce *Acinetobacter* genomic species 16, alors que la simple approche phénotypique utilisant les galeries d'identification biochimiques l'avaient initialement défini comme étant une souche de *A. baumannii*. Le résultat obtenu avec l'approche génotypique était en accord avec l'absence de mise en évidence d'un gène de type *bla*_{OXA-51} dans l'isolat A154.

b. Analyse des déterminants de résistance aux antibiotiques

Aucun gène de type *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-40}, *bla*_{OXA-58} ou *bla*_{OXA-51} n'a été mis en évidence par PCR dans l'isolat A154.

Des expériences de PCR utilisant des amorces spécifiques des gènes de type *bla*_{IMP} et *bla*_{VIM}, codant pour les métallo-β-lactamases le plus souvent identifiées au sein du genre *Acinetobacter*, ont été positives pour *bla*_{VIM}. Le séquençage de l'amplicon obtenu a montré que l'isolat A154 possédait le gène *bla*_{VIM-4}.

Des expériences complémentaires de PCR utilisant des amorces spécifiques des sites 5'-CS, 3'-CS et *bla*_{VIM} ont montré que le gène *bla*_{VIM-4} faisait partie d'un intégron de classe 1, représentant le second gène cassette après le gène *aacA4* codant pour l'acétyltransférase AAC(6')-Ib, conférant une résistance aux aminosides, notamment tobramycine, nétilmicine, amikacine (Figure 31).

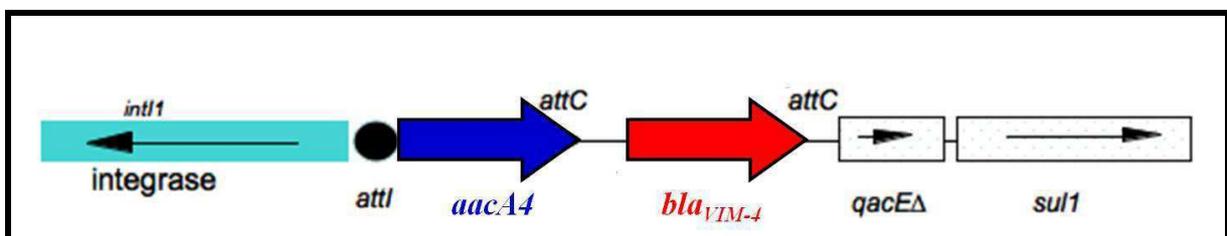


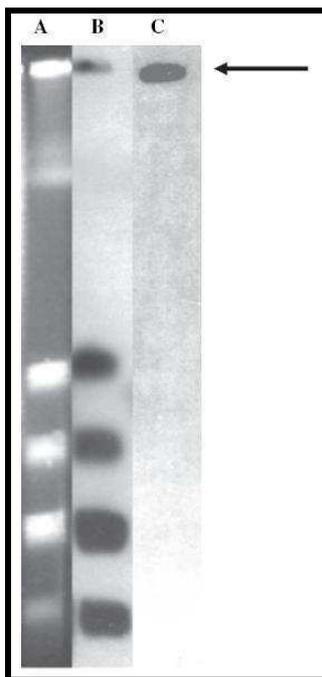
Figure 31. Environnement génétique du gène *bla*_{VIM-4} dans la souche de *Acinetobacter* genomic species 16 A154.

c. Étude du support génétique du gène *bla*_{VIM-4}

Pour déterminer la localisation chromosomique ou plasmidique du gène *bla*_{VIM-4} dans la souche de A154, nous avons utilisé la technique de restriction I-*Ceu*I déjà décrite ci-dessus pour *A. radioresistens* et *A. lwoffii*. Un même fragment d'ADN restreint co-hybride avec les deux sondes utilisées : l'une spécifique de *bla*_{VIM-4} et l'autre spécifique des gènes codant pour l'ARNr 16S. Ceci est en faveur d'une localisation chromosomique du gène *bla*_{VIM-4} dans la souche de *Acinetobacter* genomic species 16 A154.

Figure 32. Identification du support du gène *bla*_{VIM-4} dans la souche A154 de *Acinetobacter* genomic species 16.

Après extraction, l'ADN total de *Acinetobacter* genomic species 16 A154 a été restreint par l'endonucléase I-*Ceu*I qui reconnaît un site au sein des gènes codant pour la sous-unité 16S de l'ARNr, localisé sur le chromosome. Une électrophorèse en champ pulsé (piste A) puis une hybridation avec des sondes spécifiques des gènes codant pour l'ARNr 16S (piste B) et de *bla*_{VIM-4} (piste C) ont été réalisées. Un même fragment d'ADN restreint co-hybridait avec les deux sondes utilisées, ce qui suggère un support chromosomique du gène *bla*_{VIM-4} dans la souche de *Acinetobacter* genomic species 16 A154. La flèche horizontale indique la position des hybridations avec la sonde *bla*_{VIM-4}.



DISCUSSION
ET PERSPECTIVES

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'espèce bactérienne *A. baumannii* pose actuellement un problème émergent de multi-résistance aux antibiotiques, notamment aux β -lactamines. Au sein de cette famille, la résistance aux carbapénèmes est d'incidence croissante alors que ces molécules étaient considérées il y a encore peu de temps comme le traitement de choix des infections à *A. baumannii*. Un élément particulièrement important en termes de santé publique est le fait que ces infections à *A. baumannii* multi-résistant surviennent souvent par épidémies, concernant ainsi un nombre important de patients.

L'un des principaux mécanismes sous-tendant cette résistance aux carbapénèmes est lié à l'acquisition et à la production d'une oxacillinase à activité de carbapénémase codée par le gène *bla*_{OXA-23}. De nombreuses épidémies hospitalières à *A. baumannii* multirésistants produisant cette carbapénémase ont été décrites à travers le monde. Les structures génétiques à l'origine de l'acquisition et de la diffusion de ce gène ont récemment été identifiées (Corvec et coll. 2007). Afin de mieux comprendre voire de contrôler la dissémination de ce gène de résistance, il semble indispensable d'en identifier le réservoir.

Nous avons apporté les éléments expérimentaux nécessaires pour affirmer que l'espèce bactérienne *A. radioresistens* est le progéniteur du gène de résistance aux carbapénèmes *bla*_{OXA-23}.

Tout d'abord, l'amplification par PCR utilisant des amorces nucléotidiques spécifiques de ce gène a permis de détecter sa présence dans plusieurs souches de *A. radioresistens* dont nous disposions et dont une est la souche type provenant de la collection Institut Pasteur de Paris.

Ensuite, l'analyse des quatre séquences nucléotidiques des gènes *bla*_{OXA-23} identifiés a montré l'existence de plusieurs variants de ce gène. Alors que le gène *bla*_{OXA-23} présent dans la souche *A. radioresistens* A possédait 100% d'identité avec la séquence nucléotidique connue de ce gène, les gènes de type *bla*_{OXA-23} présents dans les trois autres souches de *A. radioresistens* présentaient un pourcentage d'identité compris entre 96 et 98%, correspondant, au niveau protéique, à un nombre de changements d'acides aminés limité.

Élément important, nous avons montré que les gènes de type *bla*_{OXA-23} sont localisés sur le chromosome bactérien de *A. radioresistens*.

Enfin, le gène codant pour une ATPase et situé proche du gène *bla*_{OXA-23} au sein des structures génétiques acquises Tn2006 et Tn2007 chez *A. baumannii* a été détecté par PCR

dans les quatre souches de *A. radioresistens* étudiées. Or le transposon composite Tn2006 est une structure mobile à l'origine de l'acquisition du gène *bla*_{OXA-23} dans la souche de *A. baumannii* Ab 13 (Figure 13). Ceci indique que le phénomène de transposition ayant mobilisé le gène *bla*_{OXA-23} de *A. radioresistens* vers *A. baumannii* a été à l'origine, lors du même processus, de la mobilisation du gène codant pour l'ATPase.

L'expression de ces gènes au sein de *A. radioresistens*, si elle existe, semble très faible.

Anciennement dénommé *Acinetobacter* genomic species 12, *A. radioresistens* fait partie de la flore commensale cutanée humaine tant chez des sujets sains (Berlau et coll. 1999) que chez des patients hospitalisés (Seifert 1997). *A. radioresistens* a un rôle pathogène décrit uniquement en cas d'immunodépression avec un cas clinique rapporté de bactériémie chez une patiente infectée par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Visca et coll. 2001). Mais son importance en clinique est probablement sous-estimée, notamment parce que les méthodes d'identification bactérienne ne le distinguent pas aisément d'autres espèces de *Acinetobacter*. Une équipe américaine a décrit une souche de *A. radioresistens* résistante aux carbapénèmes présentant un variant du gène *bla*_{OXA-23} (*bla*_{OXA-133} codant pour une enzyme possédant une seule mutation par rapport à OXA-102) et, de manière intéressante, le gène *bla*_{OXA-58} de support plasmidique (Mendes et coll. 2009). La résistance aux carbapénèmes dans cette souche était attribuée à l'expression de ce dernier gène, comme l'ont montré des expériences de RT-PCR quantitative.

Comment le gène *bla*_{OXA-23} a-t-il disséminé de *A. radioresistens* à *A. baumannii* ?

Il a été montré que l'acquisition et l'expression du gène *bla*_{OXA-23} impliquait la séquence d'insertion IS*Aba1* (Corvec et coll. 2007). Notamment, le gène *bla*_{OXA-23} était associé à deux copies de IS*Aba1* sous la forme du transposon composite Tn2006. La séquence d'insertion IS*Aba1*, membre de la famille IS4, est la structure génétique mobile la plus fréquemment rapportée chez *A. baumannii*. A titre d'exemple, une analyse *in silico* a permis d'identifier 21 copies de IS*Aba1* dans le génome de la souche de *A. baumannii* AYE (Vallenet et coll. 2008). L'implication significative de cette séquence d'insertion dans la plasticité génétique de cette espèce bactérienne semble donc importante. Afin de mieux comprendre la mobilisation du gène *bla*_{OXA-23}, notre équipe a récemment étudié *in vitro* les propriétés de transposition de IS*Aba1* seule et du transposon composite Tn2006 dans un modèle expérimental chez *E. coli* (Mugnier et coll. 2008). IS*Aba1* seule était capable de transposer dans un modèle de *E. coli* à une fréquence de 10⁻⁷. La fréquence de transposition de Tn2006 chez *E. coli* était de l'ordre de 10⁻⁸. Nous pouvons supposer qu'au sein du génome de *A. radioresistens*, une première

copie de IS*Abal* s'est insérée en amont du gène *bla*_{OXA-23}, apportant ainsi des séquences promotrices. Une seconde copie se serait insérée en aval, formant ainsi le transposon composite Tn2006. Cette structure aurait transposé sur un plasmide qui aurait ensuite disséminé chez *A. baumannii*.

Une étude épidémiologique récente (Mugnier et coll. 2010) portant sur une collection mondiale de souches *A. baumannii* OXA-23 a montré que l'actuelle dissémination du gène *bla*_{OXA-23} est conduite par au moins huit clones et associée à différentes structures génétiques et différents plasmides. La propagation du gène *bla*_{OXA-23} apparaît donc complexe, d'autant plus difficile à contrôler qu'elle semble associée à de multiples entités.

Nous avons tenté de mettre en évidence un co-portage de *A. radioresistens* et *A. baumannii* sur la peau de sujets sains et de patients afin d'appuyer l'hypothèse selon laquelle l'échange du gène *bla*_{OXA-23} entre ces deux germes pourrait avoir eu lieu sur la peau. Nous nous sommes intéressés aux patients de réanimation susceptibles d'être porteurs de *A. baumannii* et aux patients présentant un pied diabétique car 3 de nos 4 souches provenaient de tels patients. Sur les 84 prélèvements effectués, 4 souches de *A. baumannii* ont été isolées mais aucun *A. radioresistens*.

L'identification d'un progéniteur de gène de résistance est rare. Les principaux exemples concernant les gènes de β -lactamases en sont :

- *K. pneumoniae*, progénitrice du gène codant pour SHV, β -lactamase à spectre étendu (β LSE) identifiée chez les *Enterobacteriaceae*
- *Kluyvera* spp., espèces progénitrices du gène codant pour CTX-M, β LSE identifiée chez les *Enterobacteriaceae*
- *Hafnia alvei* pour ACC-1, *Citrobacter freundii* pour CMY, *Morganella morganii* pour DHA sont des exemples de progéniteurs de gènes codant pour des céphalosporinases ayant diffusé au sein des *Enterobacteriaceae*
- *Shewanella oneidensis*, progénitrice du gène codant pour OXA-48 et *Shewanella xiamenensis*, progénitrice du gène codant pour le variant OXA-181 de OXA-48, carbapénèmases identifiées chez *K. pneumoniae*

Après l'identification de *A. radioresistens* comme progéniteur du gène *bla*_{OXA-23}, nous avons émis l'hypothèse que d'autres espèces de *Acinetobacter* spp. pouvaient être les progéniteurs d'autres gènes codant pour des oxacillinases à activité de carbapénémase, connues (OXA-40, OXA-58, OXA-143) ou inconnues.

Nous avons identifié l'espèce *A. lwoffii* (synonyme de *Acinetobacter* genomic species 9) comme progéiteur d'un gène codant pour une nouvelle oxacilline à activité de carbapénémase : OXA-134. Malgré une séquence protéique différant significativement de OXA-23, OXA-134 partage une même activité enzymatique.

A. lwoffii est un micro-organisme commensal identifié sur la peau humaine, le périnée et l'oropharynx de 20 à 25% de volontaires sains. Ce germe a été impliqué dans des infections de type endocardites, endophtalmies, méningites, gastrites, bactériémies secondaires à des infections de cathéter chez des patients immunodéprimés ou secondaires à des gastroentérites aiguës (Espinal et coll. 2011). Comme pour de nombreuses espèces de *Acinetobacter* non-*baumannii*, le pouvoir pathogène de *A. lwoffii* peut être sous-estimé du fait des difficultés d'identification de ces souches. L'identification du gène *bla*_{OXA-134} peut être utilisée comme outil moléculaire de complément pour l'identification rapide de souches appartenant à l'espèce *A. lwoffii*, en servant de marqueur d'espèce.

Ce gène a été détecté chez *A. lwoffii* par PCR en utilisant des amorces internes spécifiques d'un autre gène, le gène *bla*_{OXA-23}. Afin d'obtenir la séquence entière du gène *bla*_{OXA-134}, des expériences de TAIL (Thermal Asymmetric InterLaced)-PCR ont été réalisées. Cette méthode est très intéressante pour caractériser les séquences génomiques inconnues flanquant un fragment nucléotidique connu. Elle constitue une alternative utile à la caractérisation habituelle d'un gène de β -lactamase par clonage, lorsque le gène cible à cloner s'exprime peu. Une fois la séquence entière du gène *bla*_{OXA-134} obtenue, des amorces externes spécifiques de ce gène ont été obtenues et utilisées pour le screening et le séquençage de ce gène dans d'autres souches de *A. lwoffii*.

A. lwoffii a été identifié comme le réservoir d'un nouveau gène de carbapénémase. Il est possible que ce gène, de manière similaire au gène *bla*_{OXA-23} dont le réservoir est *A. radioresistens*, puisse disséminer dans d'autres espèces de genre *Acinetobacter*, notamment *A. baumannii*, et ainsi être une source de résistance acquise aux carbapénèmes dans ces souches. La présence de ce gène a été recherchée dans une collection de souches de *A. baumannii* de provenance internationale, dont la moitié était résistante aux carbapénèmes. Aucune des souches testées ne possédait un gène de type *bla*_{OXA-134}. La recherche de ce gène devrait être systématique dans les investigations moléculaires réalisées devant une souche de *A. baumannii* résistante aux carbapénèmes, surtout lorsque la détection des autres gènes de carbapénémases a été négative.

Nous avons identifié les oxacillinases naturelles des espèces *A. johnsonii*, *A. calcoaceticus* et *A. haemolyticus*, dénommées respectivement OXA-211, OXA-213 et OXA-214. Ces oxacillinases présentaient toutes, à des degrés divers, des propriétés de carbapénémase. Les gènes codant pour ces β -lactamases ont pu être identifiés par PCR en utilisant des amorces dégénérées internes choisies au sein des séquences nucléotidiques correspondantes aux régions protéiques conservées des différentes CHDLs connues : OXA-23, OXA-40, OXA-51, OXA-58, OXA-134 et OXA-143. L'analyse des génomes complets disponibles de *A. johnsonii*, *A. calcoaceticus* et *A. haemolyticus* nous a permis d'obtenir les séquences entières de ces gènes. Comme pour *bla*_{OXA-51} chez *A. baumannii*, *bla*_{OXA-23} chez *A. radioresistens*, *bla*_{OXA-134} chez *A. lwoffii*, les gènes de type *bla*_{OXA-211}, *bla*_{OXA-213} et *bla*_{OXA-214} pourraient ainsi être utilisés comme outil moléculaire d'identification d'espèce pour *A. johnsonii*, *A. calcoaceticus* et *A. haemolyticus* respectivement. Ces espèces ont un impact clinique variable : *A. haemolyticus* a été décrit comme agent responsable d'endocardite et de diarrhée sanglante avec production de Shiga toxine (Castellanos Martinez et coll. 1995; Grotiuz et coll. 2006) et *A. johnsonii* a été associé à des bactériémies secondaires à des infections de cathéter (Seifert et coll. 1993) ; *A. calcoaceticus* est classiquement considéré comme une espèce de l'environnement sans réel impact clinique mais celui-ci peut largement être sous-estimé par le fait que *A. calcoaceticus* est très proche de *A. baumannii*.

En quoi ces gènes codant pour des oxacillinases naturelles contribuent-ils à la résistance aux antibiotiques des espèces qui les possèdent naturellement, alors qu'ils ne sont généralement peu ou pas exprimés et que les enzymes qu'ils codent ont de faibles propriétés catalytiques?

Il semble que la présence de séquences d'insertion situées en amont de ces gènes, notamment de *ISAbal* pour *bla*_{OXA-51-like}, joue un rôle important en apportant des séquences promotrices pouvant conduire à la surexpression de ces gènes.

Le rôle de *ISAbal* dans la surexpression du gène *bla*_{ADC}, codant pour la céphalosporinase chromosomique AmpC de *A. baumannii* a été démontré notamment par une évaluation quantitative de la transcription de ce gène en utilisant une technique de RT-PCR. *ISAbal* est souvent identifiée en amont des gènes de type *bla*_{OXA-51} chez *A. baumannii* et l'hypothèse d'une surexpression de ce gène par *ISAbal* a été émise dès 2006 (Turton et coll. 2006). Certaines équipes ont mis en évidence cette surexpression par RT-PCR (Hu et coll. 2007 ; Ruiz et coll. 2007). Toutefois, la contribution réelle de la structure *ISAbal-bla*_{OXA-51-like} dans la résistance aux carbapénèmes chez *A. baumannii* reste incertaine puisque cette structure a

été identifiée à la fois dans des souches résistantes et des souches sensibles aux carbapénèmes (Turton et coll. 2006 ; Hu et coll. 2007 ; Ruiz et coll. 2007).

Notre étude portant sur la sélection *in vivo* d'une souche de *A. baumannii* de sensibilité diminuée aux carbapénèmes médiée par la surexpression du gène codant pour l'oxacillinase naturelle de *A. baumannii* OXA-66 apporte quelques éléments de réponse.

En effet, deux souches isogéniques isolées chez un même patient, l'une au début et l'autre à la fin d'un traitement par imipénème, présentaient une sensibilité aux carbapénèmes conservée pour la première et diminuée pour la deuxième souche. Parmi toutes les investigations moléculaires réalisées, seul l'environnement génétique du gène de type *bla*_{OXA-51} (ici le gène *bla*_{OXA-66}) différait entre les deux souches : la première souche ne comportait pas *ISAbal* en amont de ce gène (alors que *ISAbal* était présente, ailleurs, sur son génome) alors que la deuxième souche possédait la structure *ISAbal-bla*_{OXA-66}. L'étude quantitative de l'expression du gène *bla*_{OXA-66} dans les deux souches par RT-PCR a montré que celle-ci était 50 fois supérieure lorsque *ISAbal* était identifiée en amont de ce gène, confirmant les données d'études précédentes (Turton et coll. 2006 ; Hu et coll. 2007 ; Ruiz et coll. 2007).

Nous avons inactivé le gène de type *bla*_{OXA-51} afin d'évaluer précisément le rôle de ce gène dans la résistance aux carbapénèmes. Cette inactivation a été réalisée dans la souche de *A. baumannii* A2 qui comportait la structure *ISAbal-bla*_{OXA-66}. Le mutant A2 (Δ OXA-66) ainsi obtenu présentait une sensibilité aux carbapénèmes plus grande que la souche A2 et, de manière intéressante, plus grande aussi que celle de la souche A1 qui comportait *bla*_{OXA-66} seul. Ainsi, il a été démontré que le gène *bla*_{OXA-66} était impliqué dans la réduction de sensibilité aux carbapénèmes chez *A. baumannii*, même lorsqu'il est faiblement exprimé comme dans la souche A1. A notre connaissance, cette étude constitue la première description d'une sélection *in vivo* d'une réduction de sensibilité aux carbapénèmes chez *A. baumannii*. Depuis, Higgins et al. (Higgins et coll. 2010) ont rapporté la sélection *in vivo* de *A. baumannii* multirésistant notamment aux carbapénèmes au cours de l'hospitalisation d'une patiente en réanimation neurochirurgicale pendant trois mois et ayant reçu des antibiotiques tout au long de son hospitalisation. La résistance aux antibiotiques était notamment médiée par la mutation de *bla*_{OXA-164} en *bla*_{OXA-58} et à la surexpression du système d'efflux *adeB*.

D'autres séquences d'insertion peuvent être impliquées dans la résistance aux antibiotiques chez *A. baumannii*. Ainsi, nous avons pu identifier une nouvelle séquence d'insertion, *ISAbal9*, à l'origine de la surexpression du gène *bla*_{OXA-51} dans la souche Ab5 issue d'une collection de souches de *A. baumannii* provenant de Grèce. Les mesures

quantitatives de l'expression de *bla*_{OXA-51} ont montré que celle-ci était 8 fois plus élevée avec la structure comprenant *ISAbal9* et *ISAbal1* versus *ISAbal1* seule en amont de *bla*_{OXA-51}. Cette surexpression repose sur l'apport de séquences promotrices par *ISAbal9*, comme ceci a déjà été décrit pour *ISAbal1*. De manière intéressante, *ISAbal9* a ensuite été identifiée en amont d'un autre gène de résistance chez *A. baumannii*, le gène *bla*_{RTG-4} qui code pour une β -lactamase à spectre étendu hydrolysant particulièrement le cefepime et le ceftiprome (Potron et coll. 2009).

Nous avons vu que la résistance aux carbapénèmes au sein du genre *Acinetobacter* est principalement liée à la production d'oxacillinases à activité de carbapénémase ou CHDL. D'autres carbapénémases, les métallob-lactamases, ont plus rarement été décrites chez *Acinetobacter*. Ces enzymes, au spectre d'hydrolyse très large incluant toutes les β -lactamines sauf l'aztréonam, ont été essentiellement décrites au sein du genre *Pseudomonas*.

Nous avons rapporté la première identification de la métallob-lactamase VIM-4 au sein du genre *Acinetobacter*. Cette enzyme, mutant ponctuel de VIM-1 (Ser175Arg), a été identifiée pour la première fois chez *P. aeruginosa* en Grèce en 2002 (Pournaras et coll. 2002). Depuis, elle a été identifiée chez *P. aeruginosa* en Pologne, Hongrie et Grèce, chez *K. pneumoniae* en Italie et Corée du Sud et chez *E. cloacae* en Italie (Luzzaro et coll. 2004) et chez *Aeromonas hydrophila* en Hongrie (Libisch et coll. 2008).

Nous avons identifié VIM-4 dans une souche de *Acinetobacter* non-*baumannii*, *Acinetobacter* genomic species 16, confirmant ainsi que des espèces moins importantes cliniquement que *A. baumannii*, peuvent posséder des déterminants de résistance aux antibiotiques et en constituer ainsi un réservoir.

Il est aussi important de noter que la souche de *Acinetobacter* spp. dans laquelle nous décrivons VIM-4 provient d'un pays dans lequel VIM-4 a déjà été décrit chez *P. aeruginosa*. Ainsi, comme ceci a déjà été décrit pour *bla*_{VIM-1} en Grèce, il s'agit d'un exemple supplémentaire de l'identification d'un gène de résistance largement présent chez *P. aeruginosa* et capable de traverser la barrière d'espèce pour atteindre *Acinetobacter* spp.

Nos travaux conduisent à évoquer de nouvelles perspectives de recherche :

✓ Quelles sont les espèces progénitrices des autres gènes codant pour les CHDLs décrites chez *A. baumannii*, notamment *bla*_{OXA-40}, *bla*_{OXA-58} et *bla*_{OXA-143} ? Notre panel d'espèces du genre *Acinetobacter*, bien que comprenant 23 espèces, n'était pas exhaustif. En

effet, pratiquement autant d'espèces de *Acinetobacter* décrites n'ont pas été testées pour la recherche de gènes de CHDLs. Il conviendrait donc d'élargir notre panel afin de tenter de détecter ces gènes par PCR.

✓ Les gènes de CHDLs que nous avons nouvellement décrits comme *bla*_{OXA-134} de *A. lwoffii* ont-ils déjà disséminés chez *A. baumannii* ? Si ce n'est pas le cas, comment expliquer la dissémination large de *bla*_{OXA-23} chez *A. baumannii* à partir de *A. radioresistens* et l'absence de dissémination des autres gènes de CHDLs décrits ?

✓ Où se produit le transfert du gène chromosomique *bla*_{OXA-23} de *A. radioresistens* à *A. baumannii* ? Deux hypothèses peuvent être émises : soit dans l'environnement, soit chez l'Homme ou l'Animal.

✓ Quelles sont les relations entre l'utilisation des antibiotiques, notamment des carbapénèmes, et l'émergence des oxacillinases aux propriétés de carbapénémases ?

✓ Quels sont les réservoirs des gènes de métallo- β -lactamases dont la dissémination chez *Acinetobacter* est décrite de manière croissante et qui diminue de manière drastique les possibilités thérapeutiques ?

MATÉRIELS
ET MÉTHODES

MATÉRIELS ET MÉTHODES

A. Techniques bactériologiques

1. Souches bactériennes, milieux de culture

Les souches cliniques étudiées ont été identifiées sur un plan phénotypique grâce à la réalisation d'une galerie de tests biochimiques API 20 NE (BioMérieux, Meylan, France), mais également sur un plan génotypique par séquençage des gènes codant pour l'ARNr 16S (Ibrahim et coll. 1997). Les caractéristiques des souches de référence sont données dans le tableau 13.

Les cultures ont été réalisées en milieux gélosé ou liquide Trypticase-Caséine Soja (TS, Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, France), les incubations s'effectuant à 30°C ou 37°C et sous agitation (150-250 rpm) pour les milieux liquides.

2. Antibiogrammes et Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI)

Les antibiogrammes ont été effectués par la technique de diffusion en milieu gélosé (Mueller-Hinton agar, MH, Bio-Rad) d'antibiotiques contenus dans des disques (Bio-Rad) selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie [CA-SFM] (www.sfm.asso.fr/) ou celles du Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI (CLSI 2010).

Dans ce travail, les CMI ont été déterminées soit par la méthode de dilutions successives de solutions mères d'antibiotiques en milieu gélosé liquide MH, soit par la méthode du E-test (AB Biodisk, Solna, Sweden) selon les recommandations du fabricant. Le E-test permet de déterminer la CMI grâce à l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel continu de l'antibiotique à tester (de 0.016 à 256 mg/L ou de 0.002 à 32 mg/L selon la molécule). Le E-test associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu liquide. Les bandelettes (supports inertes, hydrophobes, de 5 mm de largeur et de 50 mm de longueur) sont appliquées sur la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé

avec un inoculum de la souche à tester. Après incubation, l'inhibition de la croissance se traduit par une ellipse d'inhibition dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée sur la bandelette permet une interprétation rapide (Figure 33).

Figure 33. Bandelette E-test utilisée pour déterminer la CMI du méropénème d'une souche de *A. baumannii*. La valeur obtenue à l'intersection de la bandelette et de la culture indique une CMI à 4 mg/L.

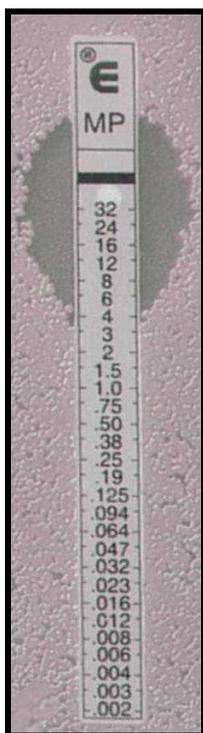


Tableau 15. Caractéristiques des souches de référence utilisées.

Souches	Caractéristiques
<i>E. coli</i> TOP10 (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France)	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 deoR nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)</i> 7697 <i>galU galK rpsL(StrR) endA1 λ</i> . Souche très proche de <i>E. coli</i> DH10B.
<i>E. coli</i> NCTC 50192	Souche contenant des plasmides de tailles connues (7 kb, 48 kb, 66 kb et 154 kb) utilisée pour la détermination de la taille approximative des plasmides naturels.
<i>A. baumannii</i> CIP7010	Souche de référence de la collection Institut Pasteur utilisée dans les expériences de transformation.
<i>A. baumannii</i> BM4547	Souche de référence de la collection Institut Pasteur utilisée dans les expériences de transformation. Dérépression du système d'efflux AdeABC (gène <i>adeR</i> inactivé).

B. Techniques de biologie moléculaire

1. Vecteurs de clonage et plasmides utilisés

Les vecteurs de clonage qui ont été utilisés sont récapitulés dans le tableau 14.

Tableau 16. Vecteurs de clonage et plasmides utilisés.

Nom	Caractéristiques
pBK-CMV Phagemid (Stratagene)	Vecteur de clonage à haut nombre de copies dérivé du plasmide pUC conférant la résistance à la kanamycine (gène <i>aph3'</i>). Chez les procaryotes, la transcription de l'insert cloné se fait à partir du promoteur P_{lac} . Taille : 4,5 kb.
pCR-BluntII- TOPO (Invitrogen)	Vecteur à haut nombre de copies, permettant le clonage direct de produits de PCR présentant des bouts francs. Les cellules ayant reçu un plasmide dépourvu d'insert sont éliminées du fait de l'expression du gène toxique <i>ccdB</i> . Il confère la résistance à la kanamycine. À noter que ce plasmide n'est pas conjugatif. Taille : 3,5 kb.
pACYC184 (New England Biolabs)	Vecteur de clonage à faible nombre de copies. Il possède une origine de réplication p15A, il est donc compatible avec des plasmides de type ColE1. Il confère une résistance à la tétracycline et au chloramphénicol. Taille : 4,2 kb.

2. Purification des acides nucléiques

2.1. Extraction d'ADN génomique

Les extractions d'ADN génomique ont été réalisées par lyse cellulaire en présence de lysozyme et de protéinase K (Derbyshire et coll. 1987). Après purification (phénol-chloroforme), précipitation (NaCl, isopropanol), et resuspension (H_2O), l'ADN extrait a été quantifié par mesure spectrophotométrique à 260 nm.

Une technique rapide d'extraction d'ADN total, le « boiling extract », a été employée, notamment pour réaliser des PCR sur les transformants à tester. Cette technique consiste à re-

suspendre une colonie dans 100 μ L d'eau, à chauffer cette suspension pendant 10 min à 100°C, à la refroidir sur glace pendant 1 min, puis à la centrifuger pendant 5 min à 10000 rpm. Le surnageant contenant l'ADN extrait « non purifié » peut ensuite être utilisé pour une réaction de PCR.

2.2. Extraction d'ADN plasmidique

2.2.1. Extraction de plasmides à faible et haut nombre de copies

Les extractions d'ADN plasmidique ont été réalisées à l'aide des kits de purification Plasmid Mini Kit ou Midi Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) en fonction de la quantité d'ADN désirée, selon les recommandations du fournisseur. Le principe de ces kits repose sur l'utilisation d'une technique de lyse alcaline modifiée, suivie d'une fixation de l'ADN plasmidique au niveau d'une résine échangeuse d'anions hautement sélective. Les ARN, protéines et autres impuretés sont éliminés par plusieurs lavages successifs de la résine. Une étape d'éluion suivie d'une précipitation à l'isopropanol permet de récupérer l'ADN plasmidique concentré.

Les plasmides présents en 1 ou 2 copies par cellule (ex : pOX38-Gen, environ 60 kb), ont été extraits à l'aide du kit de purification Plasmid Midi Kit (Qiagen) en appliquant le protocole « very low-copy » ou Plasmid Maxi Kit (Qiagen), selon les recommandations du fournisseur. Le principe de cette technique est identique à celui décrit précédemment, cependant le volume de culture bactérienne initial est plus important. Ces techniques permettent de recueillir suffisamment d'ADN purifié pour une utilisation directe comme matrice dans les réactions de séquençage.

2.2.2. Extraction de plasmides naturels

Pour les plasmides de plus grande taille, une technique d'extraction plus « douce » a été utilisée, c'est-à-dire permettant d'éviter les cassures des fragments chromosomiques. La technique d'extraction de Kieser (Kieser. 1984) permet d'extraire rapidement le contenu plasmidique d'une bactérie à partir d'un réisolement frais. Cette technique comprend une étape de lyse alcaline, suivie d'une purification au phénol-chloroforme acide. Il n'y a pas d'étape de purification et l'extrait plasmidique peut être déposé directement sur gel d'agarose afin de visualiser le contenu plasmidique d'une souche bactérienne. Les plasmides obtenus

par la technique d'extraction de Kieser peuvent être électroporés dans des cellules électrocompétentes, cependant cette technique d'extraction ne permet pas la réalisation de PCR ou de restriction enzymatique sur l'extrait plasmidique du fait de la présence de chloroforme.

2.3. Extraction des acides ribonucléiques

Les ARN ont été extraits à l'aide du kit RNeasy Protect Mini Kit (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur. Le matériel biologique est tout d'abord lysé et homogénéisé dans des conditions hautement dénaturantes en présence d'un tampon contenant du β -mercaptoéthanol et du guanidium isothiocyanate (GITC), qui inactive les RNases contenues dans l'extrait biologique et assure l'extraction des ARNs intacts. L'ARN est ensuite fixé sur une membrane et les contaminants sont éliminés par plusieurs lavages successifs. Après élution, la quantité d'ARN a été évaluée par spectrophotométrie UV à 260 nm.

2.4. Purification des produits de PCR

Les produits de PCR ont été purifiés à l'aide de colonnes Qiaquick (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur. Ce kit permet une purification rapide des fragments d'ADN de 100 pb à 10 kb en éliminant les nucléotides, les enzymes, le tampon de réaction, l'agarose et permet la récupération d'un ADN pur pouvant être utilisé directement dans d'autres réactions (restriction, ligation, transformation, amplification...). Le principe de ce kit repose sur une technique de centrifugation-filtration. En présence d'une forte concentration saline, l'ADN en solution est fixé à une matrice de silice, les impuretés sont éliminées par lavage. L'ADN est ensuite élué à l'aide d'une solution à faible concentration saline.

3. Digestion par les enzymes de restriction

Les enzymes de restriction reconnaissent des séquences spécifiques de l'ADN double brin et coupent cet ADN à l'intérieur ou à proximité de ces séquences. Le tampon de restriction et la température d'incubation sont choisis en fonction de l'enzyme utilisée et sont indiqués dans les recommandations des fournisseurs (New England Biolabs, Saint-Quentin-en-Yvelines, France ; GE Healthcare, Orsay, France).

4. Ligation et transformation par électroporation

Les ligations ont été réalisées avec 1 unité de T4 DNA ligase (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) selon les recommandations du fournisseur. Les produits de ligation ont été précipités et concentrés en présence d'ARNt de levure et d'éthanol, puis resuspendus dans 2 µL d'eau ultra-pure avant électroporation.

La préparation de *E. coli* électrocompétentes a été réalisée classiquement selon le protocole Bio-Rad par lavages successifs à l'eau d'une culture bactérienne en phase exponentielle de croissance ($DO_{600nm} = 0,5-0,6$). Lorsque la bactérie contenait déjà un premier plasmide, un antibiotique assurant le maintien de ce plasmide dans la cellule a été ajouté au milieu de culture. Les plasmides recombinants ont été introduits par électroporation (Gene Pulser II ; Bio-Rad) selon les recommandations du constructeur.

5. Électrophorèse en gel d'agarose

L'électrophorèse en gel d'agarose permet de séparer les fragments d'ADN en fonction de leur taille et la concentration des gels d'agarose varie en fonction de la taille des fragments d'ADN à analyser. Le tampon de migration utilisé pour les migrations courtes est le TAE (Tris-Acetate-EDTA) et pour les migrations longues le TBE (Tris-Borate-EDTA). L'ADN est visualisé grâce à l'ajout d'un agent intercalant, le bromure d'éthidium (BET), qui devient fluorescent sous ultraviolets (UV).

6. Réaction de polymérisation

6.1. Réactions d'amplification par PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Les réactions de PCR de contrôle ont été réalisées avec de la Taq DNA polymérase (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France), tandis que les fragments de PCR destinés à être clonés ont été amplifiés avec de la *Pfu* DNA polymérase (Promega, Charbonnières, France). Cette dernière enzyme possède une activité 3' et 5' exonucléasique qui permet de corriger les erreurs pouvant se produire au cours de la synthèse d'ADN.

Les réactions standards de PCR ont été effectuées selon la méthode décrite par Sambrook (Sambrook. 2001). Le mélange réactionnel classique contient en plus de la Taq DNA polymérase : 200 μM de chaque dNTP, le tampon de réaction (50 mM KCl ; 10 mM Tris-HCl pH 8,5 ; 1,5 mM MgCl_2), 0,1 μM de chaque oligonucléotide et 0,1 à 1 μg d'ADN matrice.

Les oligonucléotides utilisés dans ce travail sont présentés dans le tableau 15.

Les réactions de PCR ont été réalisées dans un thermocycleur ABI 2700 (Applied Biosystems). Une réaction de PCR classique comprend une étape de dénaturation initiale de l'ADN double brin pendant 10 min à 95°C. Cette étape est suivie de 35 cycles d'amplification de l'ADN d'intérêt avec 1 min à 95°C (dénaturation), 1 min à 50-60°C (appariement des amorces, température variable selon le T_m des amorces) et 1-5 min à 72°C (élongation, temps variable selon la taille du fragment à amplifier). Une étape finale de 10 min à 72°C permet de terminer la synthèse des brins inachevés.

Tableau 17. Oligonucléotides utilisés dans ce travail.

Désignation	Séquence (5' → 3') ^Ω	Type d'amorce
OXA-IMP1	GCAAATAMAGAATATGTSCC	<i>bla</i> _{OXA-23} , amorce interne
OXA-IMP2	CTCMACCCARCCRGTC AAC	<i>bla</i> _{OXA-23} , amorce interne, antisens
PréOXA-23A	TTTCTATTSATCTGGTGT TTA	<i>bla</i> _{OXA-23} , amorce externe
PréOXA-23B	TTAGAGGTTTCTGTCAAGCTC	<i>bla</i> _{OXA-23} , amorce externe, antisens
IS <i>Aba1a</i>	ATGCAGCGCTTCTTTGCCAGG	IS <i>Aba1</i>
IS <i>Aba1b</i>	AATGATTGGTGACAATGAAG	IS <i>Aba1b</i> , antisens
IS <i>Aba4a</i>	ATTTGAACCCATCTATTGGC	IS <i>Aba4a</i>
IS <i>Aba4b</i>	ACTCTCATATTTTTTCTT	IS <i>Aba4a</i> , antisens
P13B [†]	CGGGATCCCAGGCCCGGGAAC	Gène <i>rrs</i> (ARNr16S)
UNI14 [†]	GTGCCAGCAGCCGCGGTAAT	Gène <i>rrs</i> (ARNr16S)
PB [†]	TAACACATGCAAGTCGAAC	Gène <i>rrs</i> (ARNr16S)
BAK2 [†]	GGACTACHAGGGTATCTAT	Gène <i>rrs</i> (ARNr16S)
M13 reverse	GTCCTTTGTCGATACT	Séquençage antisens pCR-BluntII-TOPO
ATPaseB3 [*]	GTCATCCAGAAGCGTCCGG	Gène codant pour l'ATPase de Tn2006
PréOXA-134A	GAAAAATGACCAAAATTTGATCG	<i>bla</i> _{OXA-134} , amorce externe
PréOXA-134B	TATTTGCATCATCCTTCAGC	<i>bla</i> _{OXA-134} , amorce externe, antisens
OXA-CHDL A	CCHGCHTCDACHTTYAARAT	Amorces dégénérées pour CHDL
OXA-CHDL B	KYHAYABCCMWKSCCADCC	

Tableau 17 (suite). Oligonucléotides utilisés dans ce travail.

Désignation	Séquence (5'→ 3') ^Ω	Type d'amorce
OXA-calcoaceticus A	ACCGCCATATCAACTTTCC	Détection et amplification de OXA-213, CHDL naturelle de <i>A. calcoaceticus</i>
OXA-calcoaceticus B	TTGAGCACACCATTTCATCC	
OXA-haemolyticus A	TTTTCTAGCTCGGCTTTCCCC	Détection et amplification de OXA-214, CHDL naturelle de <i>A. haemolyticus</i>
OXA-haemolyticus B	ATCCCTCTAGGATGATTTCTCCC	
OXA-johnsonii A	TTTAGATCTTAGCCACCC	Détection et amplification de OXA-211, CHDL naturelle de <i>A. johnsonii</i>
OXA-johnsonii B	AATACGTCTTCTCTATGGGC	

^Ω M est A ou C, S est G ou C, R est A ou G

† P13B a été utilisée avec UNI14 et PB avec BAK2

* ATPase B3 a été utilisée avec OXA-IMP1

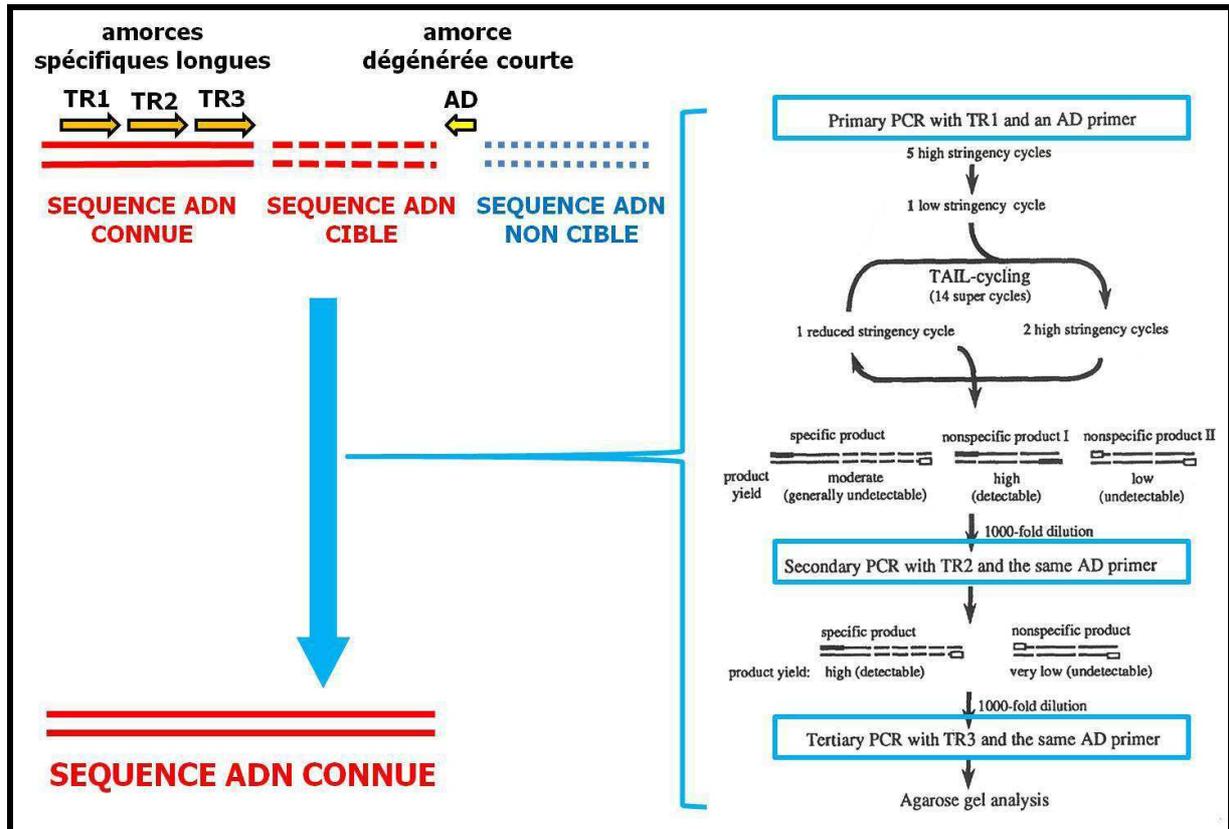
6.2. Réactions de séquençage

Le séquençage a été réalisé selon la méthode de Sanger modifiée (Sanger, 1977) en utilisant le kit BigDye Terminator v3.1 Matrix Standard Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) et le séquenceur automatique ABI Prism 3100 (Applied Biosystems), selon les recommandations du constructeur.

6.3. Réaction de TAIL-PCR (*Thermal Assymetric InterLaced-PCR*)

Cette méthode de PCR permet d'amplifier les fragments d'ADN inconnus situés autour d'une séquence d'ADN connue (Figure 34). Elle repose sur l'utilisation d'une série d'amorces spécifiques de la séquence connue (TR1, TR2, TR3) et d'une courte amorce arbitraire non spécifique (AD) présentant un T_m plus faible et pouvant se fixer au sein du fragment d'ADN adjacent inconnu. Des étapes d'appariement réalisées à différentes températures sont effectuées permettant la liaison de chaque amorce. Plusieurs amplicons non spécifiques sont obtenus en plus du fragment d'ADN cible. Une succession de cycles alternants de faibles et de fortes conditions de stringence permet d'amplifier la séquence flanquante spécifique en éliminant au fur et à mesure les séquences non spécifiques (Liu et coll. 1995).

Figure 34. Schéma représentant le principe et les grandes étapes de la TAIL-PCR (Thermal Assymetric Inter-Laced PCR). D'après Liu et coll. 1995.



C. Techniques génétiques

1. Hybridation ADN-ADN

1.1. Southern-blot

Le gel d'agarose contenant les fragments d'ADN digérés est lavé dans 3 bains successifs (HCl 0.2 M, 20 min ; NaCl 1 M et NaOH 0.4 M, 20 min ; Tris 1 M pH 7.5 et NaCl 1.5 M, 20 min). Les fragments d'ADN contenus dans le gel sont ensuite transférés par capillarité sur une membrane de nylon Hybond N+ chargée positivement qui va retenir l'ADN. Les fragments d'ADN ont ensuite été fixés de manière covalente à la membrane par exposition aux UV (UV Stratalinker 2400, Stratagene).

1.2. Hybridation non radioactive (chimioluminescence)

Des sondes internes aux gènes d'intérêts ont été préparées à partir de produits de PCR purifiés. Après dénaturation à 100°C, la sonde a été marquée par incorporation de désoxyribonucléotides (dUTP) couplés à la fluorescéine. L'hybridation de la membrane a été réalisée à 42°C selon les recommandations du fournisseur (ECLTM Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System, GE Healthcare). La révélation se fait selon le principe suivant : après blocage des sites non spécifiques et ajout d'anticorps anti-fluorescéine couplés à la peroxydase, une solution contenant du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et du luminol est déposée sur la membrane. La réduction de H₂O₂ par la peroxydase conduit à une oxydation du luminol qui produit une lumière bleue (Figure 35). Les images sont acquises avec l'imageur G-box Chemi XT16 (SynGene). Le tableau 16 donne la composition des tampons utilisés.

Tableau 18. Composition des solutions utilisées pour l'hybridation ADN-ADN.

Solution	Composition
Tampon d'hybridation	Tampon hybridation, kit Amercham ECL gold hybridization, GE healthcare, 0.5 M NaCl, 5 % liquide block
Solution de lavage 1	0.5X SSC, 6 M urée, 0.4% SDS
Solution de lavage 2	2X SSC

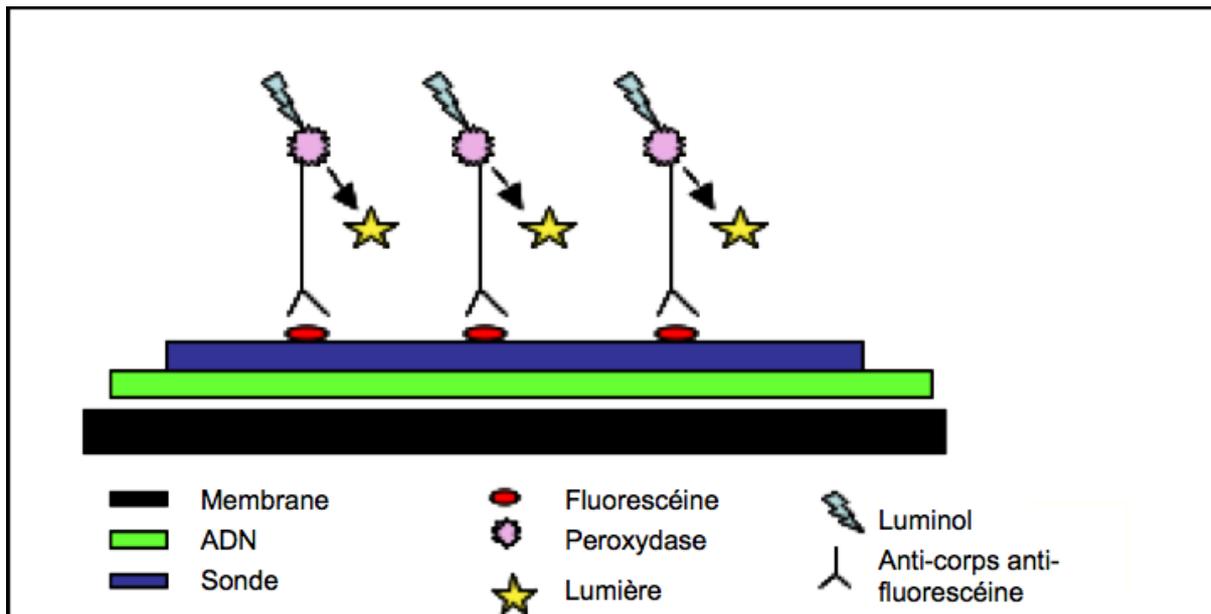


Figure 35. Principe du système de détection ECL (d'après le manuel d'instruction ECL).

2. Analyse par électrophorèse en champ pulsé après restriction enzymatique (PFGE)

L'électrophorèse en champ pulsé (PFGE pour *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*) permet de mettre en évidence le polymorphisme génétique de différentes souches bactériennes d'une même espèce. Cette technique consiste à analyser sur gel d'agarose, les segments d'ADN de grande taille, obtenus après digestion enzymatique de l'ADN total des souches bactériennes.

Les bactéries ont été cultivées jusqu'à l'obtention d'une densité optique comprise entre 0.8 et 1 (à 600 nm). Un millilitre de cellules a été centrifugé, lavé et suspendu dans le tampon de suspension préalablement équilibré à 50°C. Les bactéries sont incluses dans un bloc d'agarose à 2% à basse température de fusion. Les blocs sont incubés pendant 2 h à 37°C dans un tampon de lyse puis incubés dans une solution de protéinase K pendant 16 h à 50°C. La protéinase K est ensuite éliminée par plusieurs lavages dont un avec une solution de lavage contenant du phénylméthane sulfonyl fluoride (PMSF) à 1 mM (inhibiteur de protéase). La composition des tampons est présentée dans le tableau 17.

L'ADN total des cellules de *A. baumannii* a été digéré avec l'enzyme de restriction *ApaI* pendant 16 h à température ambiante (New England Biolabs, St-Quentin en Yvelines, France). Les conditions utilisées pour l'électrophorèse ont été les suivantes : 6 Volts par centimètre pendant 10 h 30 avec des changements de direction du courant toutes les 3 à 8 secondes et 10 h 30 avec des changements de direction du courant toutes les 12 à 20 secondes. Après électrophorèse, le gel a été coloré au BET (0.5 µg/mL) pendant 30 minutes et les profils génétiques ont été visualisés sous UV.

Tableau 19. Composition des solutions utilisées pour l'électrophorèse en champ pulsé.

Solution	Composition
Tampon de suspension	10 mM Tris pH 7.2 ; 20 mM NaCl ; 50 mM EDTA
Tampon de lyse	10 mM Tris pH 7.2 ; 50 mM NaCl ; 0.2% deoxycholate de sodium ; 0.5% sodium laurylsarcosine ; 50 µg/mL lysosyme
Tampon de protéinase K	100 mM EDTA pH 8 ; 0.2% deoxycholate de sodium ; 1% sodium laurylsarcosine ; 20 µg/mL protéinase K
Tampon de lavage	20 mM Tris pH 8 ; 50 mM EDTA

Pour les hybridations ADN-ADN, l'enzyme utilisée a été *I-CeuI* (Ozyme, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Il s'agit d'une endonucléase, codée par un intron du gène codant pour l'ARNr 23S (grande sous unité du ribosome de *Clamydomonas eugametos*) (Liu et coll. 1995). Elle reconnaît un site de 26 pb situé dans les gènes codant pour les ARNr 16S. Cette digestion permet d'obtenir un nombre limité de fragments. La restriction enzymatique de l'ADN a été réalisée pendant 2 h à 37°C. Les conditions utilisées pour l'électrophorèse ont été les suivantes: 5 V/cm pendant 11 h avec des changements de direction du courant toutes les 20 à 120 secondes puis pendant 9 h avec des changements de direction du courant toutes les 60 à 100 secondes.

D. Techniques biochimiques

1. Extraction des β -lactamases

L'extraction a été réalisée à partir de culture en phase exponentielle de croissance. Les bactéries ont été centrifugées et remises en suspension dans du tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7. Le fractionnement cellulaire a été réalisé par sonication pendant 1 min à 40 Hz en utilisant un phospholyser Vibra Cell 75022 (Bioblock). Les fractions solubles (enzymes) ont été séparées des fractions insolubles (débris cellulaires) par centrifugation. Le surnageant contenant les β -lactamases a été prélevé et utilisé pour les mesures d'activités enzymatiques, les déterminations de point isoélectriques et les dosages protéiques.

2. Purification des β -lactamases par chromatographie d'échange d'ions

La purification de la β -lactamase OXA-134a a été effectuée à l'aide d'une colonne échangeuse d'anions. Après traitement à la DNase et ultracentrifugation à 40000 g pendant 1 heure, l'extrait a été chargé sur deux colonnes Q-Sépharose successives avec des tampons de 20 mM de diethanolamine (pH 8.5) et 20 mM diethanolamine (pH 9.5). La protéine a été retenue et ensuite éluée par un gradient dégressif de NaCl et collectée dans différentes fractions. La présence de la β -lactamase a été testée *via* une β -lactamine chromogène, la nitrocéfine. Les fractions présentant un maximum d'activité enzymatique ont été regroupées. Afin de remettre l'enzyme à pH 7, une dialyse a été effectuée pendant 24 heures sous agitation, à 4°C, avec un tampon Na_2HPO_4 et NaH_2PO_4 pH 7. Ceci constitue l'extrait enzymatique purifié.

3. Dosage des protéines

La quantité de protéine a été déterminée par la méthode de Bradford. Cette méthode est basée sur la variation de l'absorbance d'une solution acide de Coomassie en présence de protéines. L'absorbance de la solution passe de 465 nm à 595 nm en présence de protéines. Le sérum d'albumine bovine a été utilisé comme standard pour la réalisation d'une gamme

étalon. La densité optique a été mesurée à une longueur d'onde de 595 nm à l'aide du spectrophotomètre (Ultrospec 2000 Pharmacia Biotech).

4. Détermination des constantes enzymatiques

L'enzyme, purifiée et dosée, a été utilisée pour les mesures des constantes enzymatiques. L'expérience a été réalisée à température ambiante avec 100 μM de tampon de phosphate de sodium à pH 7, pendant 10 min, pour chaque antibiotique testé. L'hydrolyse des différents antibiotiques a été mesurée en suivant, au cours du temps et à longueur d'onde optimale pour chaque antibiotique, la variation de densité optique résultant de l'ouverture du cycle β -lactame par la β -lactamase.

Un certain nombre de paramètres enzymatiques ont été déterminés.

Par analyse en régression linéaire de la représentation graphique d'Eadie-Hofstee, $V_i = f(V_i/S)$, où V_i représente la vitesse initiale d'hydrolyse et S la concentration en substrat, le K_m et la variation de densité optique par minute sont obtenus.

- ✓ Le K_m représente la constante de Michaëlis-Menten, dont la valeur est inversement proportionnelle à l'affinité enzyme-substrat.
- ✓ La vitesse maximale d'hydrolyse du substrat est calculée en rapportant la variation de densité optique par minute sur le coefficient d'extinction molaire du substrat.
- ✓ Le k_{cat} , nombre de molécules de substrat détruites par une molécule d'enzyme par unité de temps à concentration saturante de substrat, est déterminé en rapportant la vitesse maximale d'hydrolyse sur la concentration protéique.
- ✓ L'activité enzymatique est déterminée en rapportant la variation de densité optique par minute sur le coefficient d'extinction molaire spécifique des substrats. Elle est définie par le nombre de micromoles de substrat hydrolysées par minute.
- ✓ L'activité spécifique est déterminée en rapportant l'activité enzymatique sur la concentration en protéines. Elle se définit par le nombre de micromoles de substrat hydrolysées par minute et par mg de protéine.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Abraham, E. P., and E. Chain.** 1988. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. *Rev Infect Dis* **10**:677-8.
2. **Adams-Haduch, J. M., D. L. Paterson, H. E. Sidjabat, A. W. Pasculle, B. A. Potoski, C. A. Muto, L. H. Harrison, and Y. Doi.** 2008. Genetic basis of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates at a tertiary medical center in Pennsylvania. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:3837-43.
3. **Adams, M. D., G. C. Nickel, S. Bajaksouzian, H. Lavender, A. R. Murthy, M. R. Jacobs, and R. A. Bonomo.** 2009. Resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii* associated with mutations in the PmrAB two-component system. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:3628-34.
4. **Afzal-Shah, M., N. Woodford, and D. M. Livermore.** 2001. Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D beta-lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:583-8.
5. **Alfredson, D. A., and V. Korolik.** 2005. Isolation and expression of a novel molecular class D beta-lactamase, OXA-61, from *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:2515-8.
6. **Alksne, L. E., and B. A. Rasmussen.** 1997. Expression of the AsbA1, OXA-12, and AsbM1 beta-lactamases in *Aeromonas jandaei* AER 14 is coordinated by a two-component regulon. *J Bacteriol* **179**:2006-13.
7. **Ambler, R. P.** 1980. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **289**:321-31.
8. **Ambler, R. P., A. F. Coulson, J. M. Frere, J. M. Ghuysen, B. Joris, M. Forsman, R. C. Levesque, G. Tiraby, and S. G. Waley.** 1991. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem J* **276** (Pt 1):269-70.
9. **Anandham, R., H. Y. Weon, S. J. Kim, Y. S. Kim, B. Y. Kim, and S. W. Kwon.** 2010. *Acinetobacter brisouii* sp. nov., isolated from a wetland in Korea. *J Microbiol* **48**:36-9.
10. **Andriamanantena, T. S., E. Ratsima, H. C. Rakotonirina, F. Randrianirina, L. Ramparany, J. F. Carod, V. Richard, and A. Talarmin.** Dissemination of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* in various hospitals of Antananarivo Madagascar. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* **9**:17.
11. **Aubert, D., L. Poirel, J. Chevalier, S. Leotard, J. M. Pages, and P. Nordmann.** 2001. Oxacillinase-mediated resistance to cefepime and susceptibility to ceftazidime in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:1615-20.
12. **Bartual, S. G., H. Seifert, C. Hippler, M. A. Luzon, H. Wisplinghoff, and F. Rodriguez-Valera.** 2005. Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* **43**:4382-90.
13. **Beijerinck, M.** 1911. Pigmenten als oxydatieproducten gevormd door bacterien. *Versl. Koninklijke Akad. Wetensch.* **19**:1092-1103.
14. **Bergogne-Berezin, E., H. Fiedman, and M. Bendinelli.** 2008. *Acinetobacter* Biology and pathogenesis. In Springer (ed.), *Infectious Agents and Pathogenesis*.
15. **Bergogne-Berezin, E., and K. J. Towner.** 1996. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev* **9**:148-65.
16. **Berlau, J., H. Aucken, H. Malnick, and T. Pitt.** 1999a. Distribution of *Acinetobacter* species on skin of healthy humans. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **18**:179-83.
17. **Berlau, J., H. M. Aucken, E. Houang, and T. L. Pitt.** 1999b. Isolation of *Acinetobacter* spp. including *A. baumannii* from vegetables: implications for hospital-acquired infections. *J Hosp Infect* **42**:201-4.

18. **Bernards, A. T., A. J. de Beaufort, L. Dijkshoorn, and C. P. van Boven.** 1997. Outbreak of septicaemia in neonates caused by *Acinetobacter junii* investigated by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) and four typing methods. *J Hosp Infect* **35**:129-40.
19. **Bogaerts, P., G. Cuzon, T. Naas, C. Bauraing, A. Deplano, B. Lissou, P. Nordmann, and Y. Glupczynski.** 2008. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates expressing the *bla*_{OXA-23} gene associated with ISAba4 in Belgium. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:4205-6.
20. **Bojorquez, D., M. Belei, S. F. Delira, S. Sholly, J. Mead, and M. E. Tolmasky.** 1998. Characterization of OXA-9, a beta-lactamase encoded by the multiresistance transposon Tn1331. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **44**:483-91.
21. **Bonnet, R., H. Marchandin, C. Chanal, D. Sirot, R. Labia, C. De Champs, E. Jumas-Bilak, and J. Sirot.** 2002. Chromosome-encoded class D beta-lactamase OXA-23 in *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:2004-6.
22. **Bonnin, R. A., P. Nordmann, A. Potron, H. Lecuyer, J. R. Zahar, and L. Poirel.** 2011. Carbapenem-hydrolyzing GES-type extended-spectrum beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* **55**:349-54.
23. **Boo, T. W., F. Walsh, and B. Crowley.** 2009. Molecular characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter* species in an Irish university hospital: predominance of *Acinetobacter* genomic species 3. *J Med Microbiol* **58**:209-16.
24. **Bou, G., G. Cervero, M. A. Dominguez, C. Quereda, and J. Martinez-Beltran.** 2000. Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of beta-lactamases. *J Clin Microbiol* **38**:3299-305.
25. **Bouvet, P. J., and P. A. Grimont.** 1987. Identification and biotyping of clinical isolates of *Acinetobacter*. *Ann Inst Pasteur Microbiol* **138**:569-78.
26. **Bouvet, P. J., and S. Jeanjean.** 1989. Delineation of new proteolytic genomic species in the genus *Acinetobacter*. *Res Microbiol* **140**:291-9.
27. **Bouvet, P. J., and M. L. Joly-Guillou.** 2000. *Acinetobacter*, p. 1239-1256. In ESKA (ed.), *Précis de bactériologie clinique*.
28. **Brisou, J., and A. R. Prevot.** 1954. [Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under *Acromobacter* group]. *Ann Inst Pasteur (Paris)* **86**:722-8.
29. **Brown, A. G., D. Butterworth, M. Cole, G. Hanscomb, J. D. Hood, C. Reading, and G. N. Rolinson.** 1976. Naturally-occurring beta-lactamase inhibitors with antibacterial activity. *J Antibiot (Tokyo)* **29**:668-9.
30. **Brown, S., H. K. Young, and S. G. Amyes.** 2005. Characterisation of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina. *Clin Microbiol Infect* **11**:15-23.
31. **Bryskier, A.** 1984. [Classification of beta-lactams]. *Pathol Biol (Paris)* **32**:658-67.
32. **Bush, K., and G. A. Jacoby.** 2010. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **54**:969-76.
33. **Bush, K., G. A. Jacoby, and A. A. Medeiros.** 1995. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* **39**:1211-33.
34. **Carr, E. L., P. Kampfer, B. K. Patel, V. Gurtler, and R. J. Seviour.** 2003. Seven novel species of *Acinetobacter* isolated from activated sludge. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**:953-63.
35. **Castanheira, M., A. Wanger, M. Kruzel, L. M. Deshpande, and R. N. Jones.** 2008. Emergence and clonal dissemination of OXA-24- and OXA-58-producing *Acinetobacter baumannii* strains in Houston, Texas: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J Clin Microbiol* **46**:3179-80.
36. **Castellanos Martinez, E., M. Telenti Asensio, V. M. Rodriguez Blanco, M. L. Rodriguez Suarez, A. Morena Torrico, and A. Cortina Llosa.** 1995. Infective endocarditis of an interventricular patch caused by *Acinetobacter haemolyticus*. *Infection* **23**:243-5.
37. **Catel-Ferreira, M., G. Coadou, V. Molle, P. Mugnier, P. Nordmann, A. Siroy, T. Jouenne, and E. De.** 2011. Structure-function relationships of CarO, the carbapenem

- resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* **66**:2053-6.
38. **Chandler, M., and J. I. s. r. Mahillon.** 2002. Insertion sequences revisited., Mobile DNA II.
 39. **Chang, H. C., Y. F. Wei, L. Dijkshoorn, M. Vaneechoutte, C. T. Tang, and T. C. Chang.** 2005. Species-level identification of isolates of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex by sequence analysis of the 16S-23S rRNA gene spacer region. *J Clin Microbiol* **43**:1632-9.
 40. **Choi, C. H., E. Y. Lee, Y. C. Lee, T. I. Park, H. J. Kim, S. H. Hyun, S. A. Kim, S. K. Lee, and J. C. Lee.** 2005. Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. *Cell Microbiol* **7**:1127-38.
 41. **Coelho, J., N. Woodford, M. Afzal-Shah, and D. Livermore.** 2006. Occurrence of OXA-58-like carbapenemases in *Acinetobacter* spp. collected over 10 years in three continents. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:756-8.
 42. **Cornaglia, G., H. Giamarellou, and G. M. Rossolini.** 2011. Metallo-beta-lactamases: a last frontier for beta-lactams? *Lancet Infect Dis* **11**:381-93.
 43. **Corrigan, K. M., N. Y. Harmis, and M. D. Willcox.** 2001. Association of *Acinetobacter* species with contact lens-induced adverse responses. *Cornea* **20**:463-6.
 44. **Corvec, S., L. Poirel, T. Naas, H. Drugeon, and P. Nordmann.** 2007. Genetics and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene *bla_{OXA-23}* in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:1530-3.
 45. **Costa, D., P. Poeta, Y. Saenz, A. C. Coelho, M. Matos, L. Vinue, J. Rodrigues, and C. Torres.** 2008. Prevalence of antimicrobial resistance and resistance genes in faecal *Escherichia coli* isolates recovered from healthy pets. *Vet Microbiol* **127**:97-105.
 46. **Couture, F., J. Lachapelle, and R. C. Levesque.** 1992. Phylogeny of LCR-1 and OXA-5 with class A and class D beta-lactamases. *Mol Microbiol* **6**:1693-705.
 47. **Coyne, S., P. Courvalin, and B. Perichon.** 2011. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrob Agents Chemother* **55**:947-53.
 48. **Coyne, S., N. Rosenfeld, T. Lambert, P. Courvalin, and B. Perichon.** 2010. Overexpression of resistance-nodulation-cell division pump AdeFGH confers multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* **54**:4389-93.
 49. **Crawford, P. M., Jr., M. D. Conway, and G. A. Peyman.** 1997. Trauma-induced *Acinetobacter lwoffii* endophthalmitis with multi-organism recurrence: strategies with intravitreal treatment. *Eye (Lond)* **11 (Pt 6)**:863-4.
 50. **D'Arezzo, S., L. Principe, A. Capone, N. Petrosillo, A. Petrucca, and P. Visca.** 2011. Changing carbapenemase gene pattern in an epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* lineage causing multiple outbreaks in central Italy. *J Antimicrob Chemother* **66**:54-61.
 51. **Da Silva, G. J., S. Quinteira, E. Bertolo, J. C. Sousa, L. Gallego, A. Duarte, and L. Peixe.** 2004. Long-term dissemination of an OXA-40 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* clone in the Iberian Peninsula. *J Antimicrob Chemother* **54**:255-8.
 52. **Damier-Piolle, L., S. Magnet, S. Bremont, T. Lambert, and P. Courvalin.** 2008. AdeIJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:557-62.
 53. **de Beaufort, A. J., A. T. Bernardis, L. Dijkshoorn, and C. P. van Boven.** 1999. *Acinetobacter junii* causes life-threatening sepsis in preterm infants. *Acta Paediatr* **88**:772-5.
 54. **Devaud, M., F. H. Kayser, and B. Bachi.** 1982. Transposon-mediated multiple antibiotic resistance in *Acinetobacter* strains. *Antimicrob Agents Chemother* **22**:323-9.
 55. **Dijkshoorn, L., A. Nemeč, and H. Seifert.** 2007. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol* **5**:939-51.
 56. **Dijkshoorn, L., E. van Aken, L. Shunburne, T. J. van der Reijden, A. T. Bernardis, A. Nemeč, and K. J. Towner.** 2005. Prevalence of *Acinetobacter baumannii* and other *Acinetobacter* spp. in faecal samples from non-hospitalised individuals. *Clin Microbiol Infect* **11**:329-32.

57. **Doi, Y., J. M. Adams, K. Yamane, and D. L. Paterson.** 2007. Identification of 16S rRNA methylase-producing *Acinetobacter baumannii* clinical strains in North America. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:4209-10.
58. **Doi, Y., L. Poirel, D. L. Paterson, and P. Nordmann.** 2008. Characterization of a naturally occurring class D beta-lactamase from *Achromobacter xylosoxidans*. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:1952-6.
59. **Dolzani, L., E. Tonin, C. Lagatolla, L. Prandin, and C. Monti-Bragadin.** 1995. Identification of *Acinetobacter* isolates in the *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex by restriction analysis of the 16S-23S rRNA intergenic-spacer sequences. *J Clin Microbiol* **33**:1108-13.
60. **Donald, H. M., W. Scaife, S. G. Amyes, and H. K. Young.** 2000. Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA beta-lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:196-9.
61. **Doughari, H. J., P. A. Ndakidemi, I. S. Human, and S. Benade.** 2011. The Ecology, Biology and Pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: An Overview. *Microbes Environ* **26**:101-12.
62. **Ehrenstein, B., A. T. Bernards, L. Dijkshoorn, P. Gerner-Smidt, K. J. Towner, P. J. Bouvet, F. D. Daschner, and H. Grundmann.** 1996. *Acinetobacter* species identification by using tRNA spacer fingerprinting. *J Clin Microbiol* **34**:2414-20.
63. **Elisha, B. G., H. Segal, R. Jacobson, and S. Garny.** 2006. Carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*: OXA-23 and CarO. . *In* t. I. S. o. t. b. o. *Acinetobacter*. (ed.).
64. **Elisha, B. G., and L. M. Steyn.** 1991. Identification of an *Acinetobacter baumannii* gene region with sequence and organizational similarity to Tn2670. *Plasmid* **25**:96-104.
65. **Empel, J., K. Filczak, A. Mrowka, W. Hryniewicz, D. M. Livermore, and M. Gniadkowski.** 2007. Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections with PER-1 extended-spectrum beta-lactamase in Warsaw, Poland: further evidence for an international clonal complex. *J Clin Microbiol* **45**:2829-34.
66. **Endimiani, A., F. Luzzaro, R. Migliavacca, E. Mantengoli, A. M. Hujer, K. M. Hujer, L. Pagani, R. A. Bonomo, G. M. Rossolini, and A. Toniolo.** 2007. Spread in an Italian hospital of a clonal *Acinetobacter baumannii* strain producing the TEM-92 extended-spectrum beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:2211-4.
67. **Escoubas, J. M., M. F. Prere, O. Fayet, I. Salvignol, D. Galas, D. Zerbib, and M. Chandler.** 1991. Translational control of transposition activity of the bacterial insertion sequence IS1. *EMBO J* **10**:705-12.
68. **Espinal, P., I. Roca, and J. Vila.** 2011. Clinical impact and molecular basis of antimicrobial resistance in non-*baumannii* *Acinetobacter*. *Future Microbiol* **6**:495-511.
69. **Feizabadi, M. M., B. Fathollahzadeh, M. Taherikalani, M. Rasoolinejad, N. Sadeghifard, M. Aligholi, S. Soroush, and S. Mohammadi-Yegane.** 2008. Antimicrobial susceptibility patterns and distribution of blaOXA genes among *Acinetobacter* spp. Isolated from patients at Tehran hospitals. *Jpn J Infect Dis* **61**:274-8.
70. **Fernandez-Cuenca, F., L. Martinez-Martinez, M. C. Conejo, J. A. Ayala, E. J. Perea, and A. Pascual.** 2003. Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* **51**:565-74.
71. **Ferreira, A. E., D. P. Marchetti, L. M. De Oliveira, C. S. Gusatti, D. B. Fuentefria, and G. Corcao.** 2011. Presence of OXA-23-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in wastewater from hospitals in southern Brazil. *Microb Drug Resist* **17**:221-7.
72. **Fleming, A.** 1929. On the antibacterial action of cultures of a penicillium with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *British Journal of Experimental Pathology* **10**:226-236.
73. **Franceschini, N., L. Boschi, S. Pollini, R. Herman, M. Perilli, M. Galleni, J. M. Frere, G. Amicosante, and G. M. Rossolini.** 2001. Characterization of OXA-29 from *Legionella (Fluoribacter) gormanii*: molecular class D beta-lactamase with unusual properties. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:3509-16.

74. **Francey, T., F. Gaschen, J. Nicolet, and A. P. Burnens.** 2000. The role of *Acinetobacter baumannii* as a nosocomial pathogen for dogs and cats in an intensive care unit. *J Vet Intern Med* **14**:177-83.
75. **Fu, Y., J. Zhou, H. Zhou, Q. Yang, Z. Wei, Y. Yu, and L. Li.** 2010. Wide dissemination of OXA-23-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal complex 22 in multiple cities of China. *J Antimicrob Chemother* **65**:644-50.
76. **Garlantezec, R., C. Bourigault, J. M. Boles, G. Prat, R. Baron, J. M. Tonnelier, M. Cosse, M. Lefevre, S. Jourdain, G. Lelay, L. Daniel, M. Virmaux, I. Le Du, D. Tande, A. Renault, and B. Lejeune.** 2011. Cost-analysis of an intensive care unit closure due to an imipenem-resistant oxa-23 *Acinetobacter baumannii* outbreak. *J Hosp Infect* **77**:174-5.
77. **Garlantezec, R., C. Bourigault, J. M. Boles, G. Prat, R. Baron, J. M. Tonnelier, M. Cosse, M. Lefevre, S. Jourdain, G. Lelay, L. Daniel, M. Virmaux, I. Le Du, D. Tande, A. Renault, and B. Lejeune.** 2011. Investigation and management of an imipenem-resistant oxa-23 *Acinetobacter baumannii* outbreak in an intensive care unit. *Med Mal Infect* **41**:430-6.
78. **Gaynes, R., and J. R. Edwards.** 2005. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis* **41**:848-54.
79. **Gerner-Smidt, P.** 1992. Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *J Clin Microbiol* **30**:2680-5.
80. **Giordano, A., P. Varesi, A. Bertini, L. Villa, A. M. Dionisi, M. Venditti, P. Carfagna, I. Luzzi, C. Mancini, and A. Carattoli.** 2007. Outbreak of *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-58 in Rome, Italy. *Microb Drug Resist* **13**:37-43.
81. **Girlich, D., T. Naas, and P. Nordmann.** 2004a. Biochemical characterization of the naturally occurring oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:2043-8.
82. **Girlich, D., T. Naas, and P. Nordmann.** 2004b. OXA-60, a chromosomal, inducible, and imipenem-hydrolyzing class D beta-lactamase from *Ralstonia pickettii*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:4217-25.
83. **Girlich, D., L. Poirel, and P. Nordmann.** 2010. First isolation of the *bla*_{OXA-23} carbapenemase gene from an environmental *Acinetobacter baumannii* isolate. *Antimicrob Agents Chemother* **54**:578-9.
84. **Giuliani, F., J. D. Docquier, M. L. Riccio, L. Pagani, and G. M. Rossolini.** 2005. OXA-46, a new class D beta-lactamase of narrow substrate specificity encoded by a *bla*_{VIM-1}-containing integron from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:1973-80.
85. **Goldstein, F. W., A. Labigne-Roussel, G. Gerbaud, C. Carlier, E. Collatz, and P. Courvalin.** 1983. Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter*. *Plasmid* **10**:138-47.
86. **Grosso, F., K. R. Carvalho, S. Quinteira, A. Ramos, A. P. Carvalho-Assef, M. D. Asensi, and L. Peixe.** 2011. OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii*: a new hotspot of diversity in Rio de Janeiro? *J Antimicrob Chemother* **66**:62-5.
87. **Grotiuz, G., A. Sirok, P. Gadea, G. Varela, and F. Schelotto.** 2006. Shiga toxin 2-producing *Acinetobacter haemolyticus* associated with a case of bloody diarrhea. *J Clin Microbiol* **44**:3838-41.
88. **Guardabassi, L., L. Dijkshoorn, J. M. Collard, J. E. Olsen, and A. Dalsgaard.** 2000. Distribution and in-vitro transfer of tetracycline resistance determinants in clinical and aquatic *Acinetobacter* strains. *J Med Microbiol* **49**:929-36.
89. **Gulmez, D., N. Woodford, M. F. Palepou, S. Mushtaq, G. Metan, Y. Yakupogullari, S. Kocagoz, O. Uzun, G. Hascelik, and D. M. Livermore.** 2008. Carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Turkey with OXA-48-like carbapenemases and outer membrane protein loss. *Int J Antimicrob Agents* **31**:523-6.
90. **Gur, D., V. Korten, S. Unal, L. M. Deshpande, and M. Castanheira.** 2008. Increasing carbapenem resistance due to the clonal dissemination of oxacillinase (OXA-23 and OXA-58)-producing *Acinetobacter baumannii*: report from the Turkish SENTRY Program sites. *J Med Microbiol* **57**:1529-32.

91. **Hanson, N. D., E. S. Moland, A. Hossain, S. A. Neville, I. B. Gosbell, and K. S. Thomson.** 2002. Unusual *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* isolate producing CMY-7, SHV-9 and OXA-30 beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother* **49**:1011-4.
92. **Harder, K. J., H. Nikaido, and M. Matsushashi.** 1981. Mutants of *Escherichia coli* that are resistant to certain beta-lactam compounds lack the ompF porin. *Antimicrob Agents Chemother* **20**:549-52.
93. **He, C., Y. Xie, H. Fan, M. Kang, C. Tao, R. Zhang, Y. Hu, Z. Chen, and L. Wang.** 2011. Spread of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* of European clone II in Western China. *Int J Antimicrob Agents* **38**:257-60.
94. **Hedge, P. J., and B. G. Spratt.** 1985. Resistance to beta-lactam antibiotics by re-modelling the active site of an *E. coli* penicillin-binding protein. *Nature* **318**:478-80.
95. **Héritier, C., L. Poirel, D. Aubert, and P. Nordmann.** 2003. Genetic and functional analysis of the chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-40 of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:268-73.
96. **Héritier, C., L. Poirel, P. E. Fournier, J. M. Claverie, D. Raoult, and P. Nordmann.** 2005a. Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:4174-9.
97. **Héritier, C., L. Poirel, T. Lambert, and P. Nordmann.** 2005b. Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:3198-202.
98. **Héritier, C., L. Poirel, and P. Nordmann.** 2006. Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of IS*Aba1* in *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* **12**:123-30.
99. **Héritier, C., L. Poirel, and P. Nordmann.** 2004. Genetic and biochemical characterization of a chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing ambler class D beta-lactamase from *Shewanella algae*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:1670-5.
100. **Higgins, P. G., L. Poirel, M. Lehmann, P. Nordmann, and H. Seifert.** 2009. OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:5035-8.
101. **Higgins, P. G., T. Schneiders, A. Hamprecht, and H. Seifert.** 2010. In vivo selection of a missense mutation in *adeR* and conversion of the novel *bla*_{OXA-164} gene into *bla*_{OXA-58} in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from a hospitalized patient. *Antimicrob Agents Chemother* **54**:5021-7.
102. **Higgins, P. G., H. Wisplinghoff, O. Krut, and H. Seifert.** 2007. A PCR-based method to differentiate between *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomic species 13TU. *Clin Microbiol Infect* **13**:1199-201.
103. **Ho, P. L., A. Y. Ho, K. H. Chow, E. L. Lai, P. Ching, and W. H. Seto.** 2010. Epidemiology and clonality of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* from a healthcare region in Hong Kong. *J Hosp Infect* **74**:358-64.
104. **Horii, T., K. Tamai, M. Mitsui, S. Notake, and H. Yanagisawa.** 2011. Blood stream infections caused by *Acinetobacter ursingii* in an obstetrics ward. *Infect Genet Evol* **11**:52-6.
105. **Hu, W. S., S. M. Yao, C. P. Fung, Y. P. Hsieh, C. P. Liu, and J. F. Lin.** 2007. An OXA-66/OXA-51-like carbapenemase and possibly an efflux pump are associated with resistance to imipenem in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:3844-52.
106. **Huang, Z. M., P. H. Mao, Y. Chen, L. Wu, and J. Wu.** 2004. [Study on the molecular epidemiology of SHV type beta-lactamase-encoding genes of multiple-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* **25**:425-7.
107. **Huovinen, P., S. Huovinen, and G. A. Jacoby.** 1988. Sequence of PSE-2 beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* **32**:134-6.
108. **Irfan, S., J. F. Turton, J. Mehraj, S. Z. Siddiqui, S. Haider, A. Zafar, B. Memon, O. Afzal, and R. Hasan.** 2011. Molecular and epidemiological characterisation of clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from public and private sector intensive care units in Karachi, Pakistan. *J Hosp Infect* **78**:143-8.
109. **Janssen, P., K. Maquelin, R. Coopman, I. Tjernberg, P. Bouvet, K. Kersters, and L. Dijkshoorn.** 1997. Discrimination of *Acinetobacter* genomic species by AFLP fingerprinting. *Int J Syst Bacteriol* **47**:1179-87.

110. **Jawad, A., P. M. Hawkey, J. Heritage, and A. M. Snelling.** 1994. Description of Leeds *Acinetobacter* Medium, a new selective and differential medium for isolation of clinically important *Acinetobacter* spp., and comparison with Herellea agar and Holton's agar. *J Clin Microbiol* **32**:2353-8.
111. **Johnson, E. N., T. C. Burns, R. A. Hayda, D. R. Hospenthal, and C. K. Murray.** 2007. Infectious complications of open type III tibial fractures among combat casualties. *Clin Infect Dis* **45**:409-15.
112. **Joly-Guillou, M. L.** 2005. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. *Clin Microbiol Infect* **11**:868-73.
113. **Joris, B., P. Ledent, O. Dideberg, E. Fonze, J. Lamotte-Brasseur, J. A. Kelly, J. M. Ghuyssen, and J. M. Frere.** 1991. Comparison of the sequences of class A beta-lactamases and of the secondary structure elements of penicillin-recognizing proteins. *Antimicrob Agents Chemother* **35**:2294-301.
114. **Kang, Y. S., J. Jung, C. O. Jeon, and W. Park.** *Acinetobacter oleivorans* sp. nov. is capable of adhering to and growing on diesel-oil. *J Microbiol* **49**:29-34.
115. **Kappstein, I., H. Grundmann, T. Hauer, and C. Niemeyer.** 2000. Aerators as a reservoir of *Acinetobacter junii*: an outbreak of bacteraemia in paediatric oncology patients. *J Hosp Infect* **44**:27-30.
116. **Karunasagar, A., B. Maiti, M. Shekar, M. S. Shenoy, and I. Karunasagar.** 2011. Prevalence of OXA-type carbapenemase genes and genetic heterogeneity in clinical isolates of *Acinetobacter* spp. from Mangalore, India. *Microbiol Immunol* **55**:239-46.
117. **Kattan, J. N., M. V. Villegas, and J. P. Quinn.** 2008. New developments in carbapenems. *Clin Microbiol Infect* **14**:1102-11.
118. **Kilic, A., H. Li, A. Mellmann, A. C. Basustaoglu, M. Kul, Z. Senses, H. Aydogan, C. W. Stratton, D. Harmsen, and Y. W. Tang.** 2008. *Acinetobacter septicus* sp. nov. association with a nosocomial outbreak of bacteremia in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol* **46**:902-8.
119. **Kim, C. K., Y. Lee, H. Lee, G. J. Woo, W. Song, M. N. Kim, W. G. Lee, S. H. Jeong, K. Lee, and Y. Chong.** 2010. Prevalence and diversity of carbapenemases among imipenem-nonsusceptible *Acinetobacter* isolates in Korea: emergence of a novel OXA-182. *Diagn Microbiol Infect Dis* **68**:432-8.
120. **Kim, D., K. S. Baik, M. S. Kim, S. C. Park, S. S. Kim, M. S. Rhee, Y. S. Kwak, and C. N. Seong.** 2008. *Acinetobacter soli* sp. nov., isolated from forest soil. *J Microbiol* **46**:396-401.
121. **Koh, T. H., L. H. Sng, G. C. Wang, L. Y. Hsu, and Y. Zhao.** 2007. IMP-4 and OXA beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii* from Singapore. *J Antimicrob Chemother* **59**:627-32.
122. **Kohlenberg, A., S. Brummer, P. G. Higgins, D. Sohr, B. C. Piening, C. de Grahl, E. Halle, H. Ruden, and H. Seifert.** 2009. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the carbapenemase OXA-23 in a German university medical centre. *J Med Microbiol* **58**:1499-507.
123. **Kratz, J., F. Schmidt, and B. Wiedemann.** 1983. Transposition of a gene encoding OXA-2 beta-lactamase. *J Gen Microbiol* **129**:2951-7.
124. **Kusradze, I., S. M. Diene, M. Goderdzishvili, and J. M. Rolain.** Molecular detection of OXA carbapenemase genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Iraq and Georgia. *Int J Antimicrob Agents* **38**:164-8.
125. **La Scola, B., and D. Raoult.** 2004. *Acinetobacter baumannii* in human body louse. *Emerg Infect Dis* **10**:1671-3.
126. **Laurettil, L., M. L. Riccio, A. Mazzariol, G. Cornaglia, G. Amicosante, R. Fontana, and G. M. Rossolini.** 1999. Cloning and characterization of *bla*_{VIM}, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* **43**:1584-90.
127. **Le Hello, S., V. Falcot, F. Lacassin, F. Baumann, P. Nordmann, and T. Naas.** 2008. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in New Caledonia. *Clin Microbiol Infect* **14**:977-81.
128. **Lee, H. J., and S. S. Lee.** *Acinetobacter kyonggiensis* sp. nov., a beta-glucosidase-producing bacterium, isolated from sewage treatment plant. *J Microbiol* **48**:754-9.

129. **Lee, J. S., K. C. Lee, K. K. Kim, I. C. Hwang, C. Jang, N. G. Kim, W. H. Yeo, B. S. Kim, Y. M. Yu, and J. S. Ahn.** 2009. *Acinetobacter antiviralis* sp. nov., from Tobacco plant roots. *J Microbiol Biotechnol* **19**:250-6.
130. **Lee, K., M. N. Kim, T. Y. Choi, S. E. Cho, S. Lee, D. H. Whang, D. Yong, Y. Chong, N. Woodford, and D. M. Livermore.** 2009. Wide dissemination of OXA-type carbapenemases in clinical *Acinetobacter* spp. isolates from South Korea. *Int J Antimicrob Agents* **33**:520-4.
131. **Lee, M. F., C. F. Peng, H. J. Hsu, and Y. H. Chen.** 2008. Molecular characterisation of the metallo-beta-lactamase genes in imipenem-resistant Gram-negative bacteria from a university hospital in southern Taiwan. *Int J Antimicrob Agents* **32**:475-80.
132. **Libisch, B., C. G. Giske, B. Kovacs, T. G. Toth, and M. Fuzi.** 2008. Identification of the first VIM metallo-beta-lactamase-producing multiresistant *Aeromonas hydrophila* strain. *J Clin Microbiol* **46**:1878-80.
133. **Liebert, C. A., R. M. Hall, and A. O. Summers.** 1999. Transposon Tn21, flagship of the floating genome. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**:507-22.
134. **Lim, T. P., T. Y. Tan, W. Lee, S. Sasikala, T. T. Tan, L. Y. Hsu, and A. L. Kwa.** 2009. In vitro activity of various combinations of antimicrobials against carbapenem-resistant *Acinetobacter* species in Singapore. *J Antibiot (Tokyo)* **62**:675-9.
135. **Lin, Y. C., K. C. Hsia, Y. C. Chen, W. H. Sheng, S. C. Chang, M. H. Liao, and S. Y. Li.** 2010. Genetic basis of multidrug resistance in *Acinetobacter* clinical isolates in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother* **54**:2078-84.
136. **Lin, Y. C., W. H. Sheng, Y. C. Chen, S. C. Chang, K. C. Hsia, and S. Y. Li.** 2010. Differences in carbapenem resistance genes among *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter* genospecies 3 and *Acinetobacter* genospecies 13TU in Taiwan. *Int J Antimicrob Agents* **35**:439-43.
137. **Liu, Y. G., N. Mitsukawa, T. Oosumi, and R. F. Whittier.** 1995. Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J* **8**:457-63.
138. **Liu, Y. G., and R. F. Whittier.** 1995. Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics* **25**:674-81.
139. **Livermore, D. M., R. L. Hill, H. Thomson, A. Charlett, J. F. Turton, R. Pike, B. C. Patel, R. Manuel, S. Gillespie, I. Balakrishnan, S. P. Barrett, N. Cumberland, and M. Twagira.** Antimicrobial treatment and clinical outcome for infections with carbapenem- and multiply-resistant *Acinetobacter baumannii* around London. *Int J Antimicrob Agents* **35**:19-24.
140. **Lolans, K., T. W. Rice, L. S. Munoz-Price, and J. P. Quinn.** 2006. Multicity outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing the carbapenemase OXA-40. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:2941-5.
141. **Lowman, W., T. Kalk, C. N. Menezes, M. A. John, and M. P. Grobusch.** 2008. A case of community-acquired *Acinetobacter baumannii* meningitis - has the threat moved beyond the hospital? *J Med Microbiol* **57**:676-8.
142. **Lu, P. L., M. Doumith, D. M. Livermore, T. P. Chen, and N. Woodford.** 2009. Diversity of carbapenem resistance mechanisms in *Acinetobacter baumannii* from a Taiwan hospital: spread of plasmid-borne OXA-72 carbapenemase. *J Antimicrob Chemother* **63**:641-7.
143. **Luzzaro, F., J. D. Docquier, C. Colimon, A. Endimiani, G. Lombardi, G. Amicosante, G. M. Rossolini, and A. Toniolo.** 2004. Emergence in *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* clinical isolates of the VIM-4 metallo-beta-lactamase encoded by a conjugative plasmid. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:648-50.
144. **Mader, K., G. Terhes, E. Hajdu, E. Urban, J. Soki, T. Magyar, K. Marialigeti, M. Katona, E. Nagy, and S. Turi.** 2010. Outbreak of septicemic cases caused by *Acinetobacter ursingii* in a neonatal intensive care unit. *Int J Med Microbiol* **300**:338-40.
145. **Magnet, S., P. Courvalin, and T. Lambert.** 2001. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:3375-80.

146. **Mansour, W., L. Poirel, D. Bettaieb, O. Bouallegue, N. Boujaafar, and P. Nordmann.** 2008. Dissemination of OXA-23-producing and carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a University Hospital in Tunisia. *Microb Drug Resist* **14**:289-92.
147. **Marchand, I., L. Damier-Piolle, P. Courvalin, and T. Lambert.** 2004. Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:3298-304.
148. **Marque, S., L. Poirel, C. Heritier, S. Brisse, M. D. Blasco, R. Filip, G. Coman, T. Naas, and P. Nordmann.** 2005. Regional occurrence of plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-58 in *Acinetobacter* spp. in Europe. *J Clin Microbiol* **43**:4885-8.
149. **Marti, S., J. Rodriguez-Bano, M. Catel-Ferreira, T. Jouenne, J. Vila, H. Seifert, and E. De.** 2011. Biofilm formation at the solid-liquid and air-liquid interfaces by *Acinetobacter* species. *BMC Res Notes* **4**:5.
150. **Marti, S., J. Sanchez-Cespedes, M. D. Blasco, P. Espinal, M. Ruiz, V. Alba, and J. Vila.** 2008. Characterization of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-58 in an *Acinetobacter* phenon 6/ct13TU clinical isolate. *Diagn Microbiol Infect Dis* **61**:468-70.
151. **Marti, S., J. Sanchez-Cespedes, M. D. Blasco, M. Ruiz, P. Espinal, V. Alba, F. Fernandez-Cuenca, A. Pascual, and J. Vila.** 2008. Characterization of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase oxa-58 in an *Acinetobacter* genospecies 3 clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:2955-8.
152. **Matagne, A., J. Lamotte-Brasseur, and J. M. Frere.** 1998. Catalytic properties of class A beta-lactamases: efficiency and diversity. *Biochem J* **330** (Pt 2):581-98.
153. **Matagne, A., A. M. Misselyn-Bauduin, B. Joris, T. Erpicum, B. Granier, and J. M. Frere.** 1990. The diversity of the catalytic properties of class A beta-lactamases. *Biochem J* **265**:131-46.
154. **McMurry, L., R. E. Petrucci, Jr., and S. B. Levy.** 1980. Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**:3974-7.
155. **Medeiros, A. A., M. Cohenford, and G. A. Jacoby.** 1985. Five novel plasmid-determined beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **27**:715-9.
156. **Mendes, R. E., J. M. Bell, J. D. Turnidge, M. Castanheira, and R. N. Jones.** 2009. Emergence and widespread dissemination of OXA-23, -24/40 and -58 carbapenemases among *Acinetobacter* spp. in Asia-Pacific nations: report from the SENTRY Surveillance Program. *J Antimicrob Chemother* **63**:55-9.
157. **Mendes, R. E., T. Spanu, L. Deshpande, M. Castanheira, R. N. Jones, and G. Fadda.** 2009. Clonal dissemination of two clusters of *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 or OXA-58 in Rome, Italy. *Clin Microbiol Infect* **15**:588-92.
158. **Menon, T., S. Shanmugasundaram, B. Nandhakumar, K. Nalina, and Balasubramaniam.** 2006. Infective endocarditis due to *Acinetobacter baumannii* complex--a case report. *Indian J Pathol Microbiol* **49**:576-8.
159. **Merkier, A. K., M. Catalano, M. S. Ramirez, C. Quiroga, B. Orman, L. Ratier, A. Famiglietti, C. Vay, A. Di Martino, S. Kaufman, and D. Centron.** 2008. Polyclonal spread of *bla*_{OXA-23} and *bla*_{OXA-58} in *Acinetobacter baumannii* isolates from Argentina. *J Infect Dev Ctries* **2**:235-40.
160. **Metan, G., E. Alp, B. Aygen, and B. Sumerkan.** 2007. *Acinetobacter baumannii* meningitis in post-neurosurgical patients: clinical outcome and impact of carbapenem resistance. *J Antimicrob Chemother* **60**:197-9.
161. **Meziane-Cherif, D., T. Lambert, M. Dupechez, P. Courvalin, and M. Galimand.** 2008. Genetic and biochemical characterization of OXA-63, a new class D beta-lactamase from *Brachyspira pilosicoli* BM4442. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:1264-8.
162. **Mezzatesta, M. L., M. M. D'Andrea, R. Migliavacca, T. Giani, F. Gona, E. Nucleo, G. Fugazza, L. Pagani, G. M. Rossolini, and S. Stefani.** 2011. Epidemiological characterization and distribution of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Italy. *Clin Microbiol Infect*.

163. **Mossakowska, D., N. A. Ali, and J. W. Dale.** 1989. Oxacillin-hydrolysing beta-lactamases. A comparative analysis at nucleotide and amino acid sequence levels. *Eur J Biochem* **180**:309-18.
164. **Moubareck, C., S. Bremont, M. C. Conroy, P. Courvalin, and T. Lambert.** 2009. GES-11, a novel integron-associated GES variant in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:3579-81.
165. **Mugnier, P. D., K. M. Bindayna, L. Poirel, and P. Nordmann.** 2009. Diversity of plasmid-mediated carbapenem-hydrolysing oxacillinases among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Kingdom of Bahrain. *J Antimicrob Chemother* **63**:1071-3.
166. **Mugnier, P. D., L. Poirel, and P. Nordmann.** 2009. Functional analysis of insertion sequence IS*Aba1*, responsible for genomic plasticity of *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol* **191**:2414-8.
167. **Mulvey, M. R., D. A. Boyd, L. Baker, O. Mykytczuk, E. M. Reis, M. D. Asensi, D. P. Rodrigues, and L. K. Ng.** 2004. Characterization of a *Salmonella enterica* serovar *Agona* strain harbouring a class 1 integron containing novel OXA-type beta-lactamase *bla*_{OXA-53} and 6'-N-aminoglycoside acetyltransferase genes [*aac*(6')-I30]. *J Antimicrob Chemother* **54**:354-9.
168. **Mussi, M. A., A. S. Limansky, V. Relling, P. Ravasi, A. Arakaki, L. A. Actis, and A. M. Viale.** 2011. Horizontal gene transfer/assortative recombination within the *Acinetobacter baumannii* clinical population provides genetic diversity at the single *carO* gene encoding a major outer membrane protein channel. *J Bacteriol*.
169. **Mussi, M. A., A. S. Limansky, and A. M. Viale.** 2005. Acquisition of resistance to carbapenems in multidrug-resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii*: natural insertional inactivation of a gene encoding a member of a novel family of beta-barrel outer membrane proteins. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:1432-40.
170. **Naas, T., B. Coignard, A. Carbonne, K. Blanckaert, O. Bajolet, C. Bernet, X. Verdeil, P. Astagneau, J. C. Desenclos, and P. Nordmann.** 2006. VEB-1 Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii*, France. *Emerg Infect Dis* **12**:1214-22.
171. **Naas, T., S. Kernbaum, S. Allali, and P. Nordmann.** 2007. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*, Russia. *Emerg Infect Dis* **13**:669-71.
172. **Naas, T., M. Levy, C. Hirschauer, H. Marchandin, and P. Nordmann.** 2005. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-23 in a tertiary care hospital of Papeete, French Polynesia. *J Clin Microbiol* **43**:4826-9.
173. **Naas, T., F. Namdari, P. Bogaerts, T. D. Huang, Y. Glupczynski, and P. Nordmann.** 2008. Genetic structure associated with *bla*_{OXA-18}, encoding a clavulanic acid-inhibited extended-spectrum oxacillinase. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:3898-904.
174. **Naas, T., F. Namdari, H. Reglier-Poupet, C. Poyart, and P. Nordmann.** 2007. Panresistant extended-spectrum beta-lactamase SHV-5-producing *Acinetobacter baumannii* from New York City. *J Antimicrob Chemother* **60**:1174-6.
175. **Naas, T., and P. Nordmann.** 1999. OXA-type beta-lactamases. *Curr Pharm Des* **5**:865-79.
176. **Nagai, T., L. S. Tran, Y. Inatsu, and Y. Itoh.** 2000. A new IS4 family insertion sequence, IS*4Bsu1*, responsible for genetic instability of poly-gamma-glutamic acid production in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **182**:2387-92.
177. **Nagano, N., Y. Nagano, C. Cordevant, N. Shibata, and Y. Arakawa.** 2004. Nosocomial transmission of CTX-M-2 beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* in a neurosurgery ward. *J Clin Microbiol* **42**:3978-84.
178. **Nazic, H., L. Poirel, and P. Nordmann.** 2005. Further identification of plasmid-mediated quinolone resistance determinant in *Enterobacteriaceae* in Turkey. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:2146-7.
179. **Nemec, A., T. De Baere, I. Tjernberg, M. Vanechoutte, T. J. van der Reijden, and L. Dijkshoorn.** 2001. *Acinetobacter ursingii* sp. nov. and *Acinetobacter schindleri* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**:1891-9.
180. **Nemec, A., L. Dijkshoorn, I. Cleenwerck, T. De Baere, D. Janssens, T. J. Van Der Reijden, P. Jezek, and M. Vanechoutte.** 2003. *Acinetobacter parvus* sp. nov., a small-colony-forming species isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**:1563-7.

181. **Nemec, A., L. Dolzani, S. Brisse, P. van den Broek, and L. Dijkshoorn.** 2004. Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-European *Acinetobacter baumannii* clones. *J Med Microbiol* **53**:1233-40.
182. **Nemec, A., L. Krizova, M. Maixnerova, L. Diancourt, T. J. van der Reijden, S. Brisse, P. van den Broek, and L. Dijkshoorn.** 2008. Emergence of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* in the Czech Republic is associated with the spread of multidrug-resistant strains of European clone II. *J Antimicrob Chemother* **62**:484-9.
183. **Nemec, A., L. Krizova, M. Maixnerova, T. J. van der Reijden, P. Deschaght, V. Passet, M. Vaneechoutte, S. Brisse, and L. Dijkshoorn.** 2011. Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). *Res Microbiol* **162**:393-404.
184. **Nemec, A., M. Musilek, M. Maixnerova, T. De Baere, T. J. van der Reijden, M. Vaneechoutte, and L. Dijkshoorn.** 2009. *Acinetobacter beijerinckii* sp. nov. and *Acinetobacter gyllenbergii* sp. nov., haemolytic organisms isolated from humans. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**:118-24.
185. **Nishimura, Y., T. Ino, and H. Iizuka.** 1988. *Acinetobacter radioresistens* sp. nov. isolated from cotton and soil. *Int. J. Syst. Bacteriol* **38**:209-211.
186. **Niumsup, P., and V. Wuthiekanun.** 2002. Cloning of the class D beta-lactamase gene from *Burkholderia pseudomallei* and studies on its expression in ceftazidime-susceptible and -resistant strains. *J Antimicrob Chemother* **50**:445-55.
187. **Obana, Y.** 1986. Pathogenic significance of *Acinetobacter calcoaceticus*: analysis of experimental infection in mice. *Microbiol Immunol* **30**:645-57.
188. **Ouellette, M., L. Bissonnette, and P. H. Roy.** 1987. Precise insertion of antibiotic resistance determinants into Tn21-like transposons: nucleotide sequence of the OXA-1 beta-lactamase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:7378-82.
189. **Papagiannitsis, C. C., A. Loli, L. S. Tzouveleki, E. Tzelepi, G. Arlet, and V. Miriagou.** 2007. SCO-1, a novel plasmid-mediated class A beta-lactamase with carbenicillinase characteristics from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:2185-8.
190. **Paton, R., R. S. Miles, J. Hood, and S. G. Amyes.** 1993. ARI 1: beta-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents* **2**:81-7.
191. **Peleg, A. Y., C. Franklin, L. J. Walters, J. M. Bell, and D. W. Spelman.** 2006. OXA-58 and IMP-4 carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases in an *Acinetobacter junii* blood culture isolate from Australia. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:399-400.
192. **Peleg, A. Y., H. Seifert, and D. L. Paterson.** 2008. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev* **21**:538-82.
193. **Philippon, L. N., T. Naas, A. T. Bouthors, V. Barakett, and P. Nordmann.** 1997. OXA-18, a class D clavulanic acid-inhibited extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:2188-95.
194. **Poirel, L., S. Corvec, M. Rapoport, P. Mugnier, A. Petroni, F. Pasteran, D. Faccone, M. Galas, H. Drugeon, V. Cattoir, and P. Nordmann.** 2007. Identification of the novel narrow-spectrum beta-lactamase SCO-1 in *Acinetobacter* spp. from Argentina. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:2179-84.
195. **Poirel, L., C. Heritier, V. Tolun, and P. Nordmann.** 2004. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:15-22.
196. **Poirel, L., W. Mansour, O. Bouallegue, and P. Nordmann.** 2008. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Tunisia producing the OXA-58-like carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-97. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:1613-7.
197. **Poirel, L., S. Marque, C. Heritier, C. Segonds, G. Chabanon, and P. Nordmann.** 2005. OXA-58, a novel class D beta-lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:202-8.

198. **Poirel, L., O. Menuteau, N. Agoli, C. Cattoen, and P. Nordmann.** 2003. Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. *J Clin Microbiol* **41**:3542-7.
199. **Poirel, L., T. Naas, and P. Nordmann.** 2010. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **54**:24-38.
200. **Poirel, L., and P. Nordmann.** 2006. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect* **12**:826-36.
201. **Poirel, L., A. Potron, S. Munoz-Price, T. Cleary, and P. Nordmann.** 2011. Genetics of Acquisition of the CTX-M-15 Encoding Gene in *Acinetobacter baumannii* Isolates. In s. ICAAC (ed.), Chicago.
202. **Poole, K.** 2005. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother* **56**:20-51.
203. **Potron, A., L. Poirel, J. Croize, V. Chantepedrix, and P. Nordmann.** 2009. Genetic and biochemical characterization of the first extended-spectrum CARB-type beta-lactamase, RTG-4, from *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:3010-6.
204. **Pournaras, S., A. Tsakris, M. Maniati, L. S. Tzouveleki, and A. N. Maniatis.** 2002. Novel variant *bla*_{VIM-4} of the metallo-beta-lactamase gene *bla*_{VIM-1} in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:4026-8.
205. **Qi, C., M. Malczynski, M. Parker, and M. H. Scheetz.** 2008. Characterization of genetic diversity of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strains collected from 2004 to 2007. *J Clin Microbiol* **46**:1106-9.
206. **Quinteira, S., F. Grosso, H. Ramos, and L. Peixe.** 2007. Molecular epidemiology of imipenem-resistant *Acinetobacter haemolyticus* and *Acinetobacter baumannii* isolates carrying plasmid-mediated OXA-40 from a Portuguese hospital. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:3465-6.
207. **Ribera, A., J. Ruiz, and J. Vila.** 2003. Presence of the Tet M determinant in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:2310-2.
208. **Roberts, M. C.** 1996. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiol Rev* **19**:1-24.
209. **Robledo, I. E., E. E. Aquino, M. I. Sante, J. L. Santana, D. M. Otero, C. F. Leon, and G. J. Vazquez.** 2010. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. *Antimicrob Agents Chemother* **54**:1354-7.
210. **Rodriguez-Martinez, J. M., L. Poirel, and P. Nordmann.** 2009. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:4783-8.
211. **Rolain, J. M., P. Parola, and G. Cornaglia.** New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1): towards a new pandemic? *Clin Microbiol Infect* **16**:1699-701.
212. **Rolinson, G. N.** 1998. Forty years of beta-lactam research. *J Antimicrob Chemother* **41**:589-603.
213. **Roy, S., R. Viswanathan, A. Singh, P. Das, and S. Basu.** Gut colonization by multidrug-resistant and carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in neonates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **29**:1495-500.
214. **Ruiz, M., S. Marti, F. Fernandez-Cuenca, A. Pascual, and J. Vila.** 2007. High prevalence of carbapenem-hydrolysing oxacillinases in epidemiologically related and unrelated *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Spain. *Clin Microbiol Infect* **13**:1192-8.
215. **Salyers, A. A., N. B. Shoemaker, A. M. Stevens, and L. Y. Li.** 1995. Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. *Microbiol Rev* **59**:579-90.
216. **Sauvage, E., F. Kerff, M. Terrak, J. A. Ayala, and P. Charlier.** 2008. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* **32**:234-58.
217. **Scaife, W., H. K. Young, R. H. Paton, and S. G. Amyes.** 1995. Transferable imipenem-resistance in *Acinetobacter* species from a clinical source. *J Antimicrob Chemother* **36**:585-6.
218. **Schmith Bier, K. E., S. O. Luiz, M. C. Scheffer, A. C. Gales, M. C. Paganini, A. J. Nascimento, E. Carignano, and L. M. Dalla Costa.** 2010. Temporal evolution of

- carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Curitiba, southern Brazil. *Am J Infect Control* **38**:308-14.
219. **Scoulica, E., A. Aransay, and Y. Tselentis.** 1995. Molecular characterization of the OXA-7 beta-lactamase gene. *Antimicrob Agents Chemother* **39**:1379-82.
220. **Segal, H., S. Garny, and B. G. Elisha.** 2005. Is *ISAbal* customized for *Acinetobacter*? *FEMS Microbiol Lett* **243**:425-9.
221. **Segal, H., R. K. Jacobson, S. Garny, C. M. Bamford, and B. G. Elisha.** 2007. Extended -10 promoter in *ISAbal* upstream of *bla*_{OXA-23} from *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:3040-1.
222. **Seifert, H., R. Baginski, A. Schulze, and G. Pulverer.** 1993. Antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* species. *Antimicrob Agents Chemother* **37**:750-3.
223. **Seifert, H., R. Baginski, A. Schulze, and G. Pulverer.** 1993. The distribution of *Acinetobacter* species in clinical culture materials. *Zentralbl Bakteriol* **279**:544-52.
224. **Seifert, H., L. Dijkshoorn, P. Gerner-Smidt, N. Pelzer, I. Tjernberg, and M. Vanechoutte.** 1997. Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *J Clin Microbiol* **35**:2819-25.
225. **Seifert, H., A. Strate, A. Schulze, and G. Pulverer.** 1993. Vascular catheter-related bloodstream infection due to *Acinetobacter johnsonii* (formerly *Acinetobacter calcoaceticus* var. *lwoffii*): report of 13 cases. *Clin Infect Dis* **17**:632-6.
226. **Serrano, M. I., J. Solera, E. Martinez, and L. Saez.** 1993. [Community-acquired meningitis caused by *Acinetobacter calcoaceticus* var. *lwoffii* in a healthy host]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **11**:396-7.
227. **Sevillano, E., L. Gallego, and J. M. Garcia-Lobo.** 2009. First detection of the OXA-40 carbapenemase in *P. aeruginosa* isolates, located on a plasmid also found in *A. baumannii*. *Pathol Biol (Paris)* **57**:493-5.
228. **Seward, R. J., T. Lambert, and K. J. Towner.** 1998. Molecular epidemiology of aminoglycoside resistance in *Acinetobacter* spp. *J Med Microbiol* **47**:455-62.
229. **Shakil, S., and A. U. Khan.** 2010. Detection of CTX-M-15-producing and carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains from urine from an Indian hospital. *J Chemother* **22**:324-7.
230. **Srinivasan, V. B., G. Rajamohan, P. Pancholi, K. Stevenson, D. Tadesse, P. Patchanee, M. Marcon, and W. A. Gebreyes.** 2009. Genetic relatedness and molecular characterization of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* isolated in central Ohio, USA. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* **8**:21.
231. **Su, X. Z., J. Chen, T. Mizushima, T. Kuroda, and T. Tsuchiya.** 2005. AbeM, an H⁺-coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:4362-4.
232. **Sykes, R. B., D. P. Bonner, K. Bush, N. H. Georgopapadakou, and J. S. Wells.** 1981. Monobactams--monocyclic beta-lactam antibiotics produced by bacteria. *J Antimicrob Chemother* **8 Suppl E**:1-16.
233. **Tian, G. B., J. M. Adams-Haduch, T. Bogdanovich, A. W. Pasculle, J. P. Quinn, H. N. Wang, and Y. Doi.** Identification of diverse OXA-40 group carbapenemases, including a novel variant, OXA-160, from *Acinetobacter baumannii* in Pennsylvania. *Antimicrob Agents Chemother* **55**:429-32.
234. **Tjernberg, I., and J. Ursing.** 1989. Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. *APMIS* **97**:595-605.
235. **Toleman, M. A., K. Rolston, R. N. Jones, and T. R. Walsh.** 2003. Molecular and biochemical characterization of OXA-45, an extended-spectrum class 2d' beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:2859-63.
236. **Tolmasky, M. E., and J. H. Crosa.** 1993. Genetic organization of antibiotic resistance genes (*aac*(6')-Ib, *aadA*, and *oxa9*) in the multiresistance transposon Tn1331. *Plasmid* **29**:31-40.
237. **Trottier, V., P. G. Segura, N. Namias, D. King, L. R. Pizano, and C. I. Schulman.** 2007. Outcomes of *Acinetobacter baumannii* infection in critically ill burned patients. *J Burn Care Res* **28**:248-54.

238. **Tsakris, A., A. Ikonomidis, S. Pournaras, L. S. Tzouvelekis, D. Sofianou, N. J. Legakis, and A. N. Maniatis.** 2006. VIM-1 metallo-beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis* **12**:981-3.
239. **Turton, J. F., J. Shah, C. Ozongwu, and R. Pike.** 2010. Incidence of *Acinetobacter* species other than *A. baumannii* among clinical isolates of *Acinetobacter*: evidence for emerging species. *J Clin Microbiol* **48**:1445-9.
240. **Turton, J. F., M. E. Ward, N. Woodford, M. E. Kaufmann, R. Pike, D. M. Livermore, and T. L. Pitt.** 2006. The role of IS*AbaI* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol Lett* **258**:72-7.
241. **Vahaboglu, H., R. Ozturk, G. Aygun, F. Coskun, A. Yaman, A. Kaygusuz, H. Leblebicioglu, I. Balik, K. Aydin, and M. Otkun.** 1997. Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:2265-9.
242. **Valero, C., M. C. Farinas, D. Garcia Palomo, J. C. Mazarrasa, and J. Gonzalez Macias.** 1999. Endocarditis due to *Acinetobacter lwoffii* on native mitral valve. *Int J Cardiol* **69**:97-9.
243. **Vallenet, D., P. Nordmann, V. Barbe, L. Poirel, S. Mangenot, E. Bataille, C. Dossat, S. Gas, A. Kreimeyer, P. Lenoble, S. Oztas, J. Poulain, B. Segurens, C. Robert, C. Abergel, J. M. Claverie, D. Raoult, C. Medigue, J. Weissenbach, and S. Cruveiller.** 2008. Comparative analysis of *Acinetobacters*: three genomes for three lifestyles. *PLoS ONE* **3**:e1805.
244. **van den Broek, P. J., T. J. van der Reijden, E. van Strijen, A. V. Helmig-Schurter, A. T. Bernards, and L. Dijkshoorn.** 2009. Endemic and epidemic *Acinetobacter* species in a university hospital: an 8-year survey. *J Clin Microbiol* **47**:3593-9.
245. **Vanechoutte, M., L. A. Devriese, L. Dijkshoorn, B. Lamote, P. Deprez, G. Verschraegen, and F. Haesebrouck.** 2000. *Acinetobacter baumannii*-infected vascular catheters collected from horses in an equine clinic. *J Clin Microbiol* **38**:4280-1.
246. **Vanechoutte, M., L. Dijkshoorn, I. Tjernberg, A. Elaichouni, P. de Vos, G. Claeys, and G. Verschraegen.** 1995. Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *J Clin Microbiol* **33**:11-5.
247. **Vanechoutte, M., A. Nemeč, M. Musilek, T. J. van der Reijden, M. van den Barselaar, I. Tjernberg, W. Calame, R. Fani, T. De Baere, and L. Dijkshoorn.** 2009. Description of *Acinetobacter venetianus* ex Di Cello et al. 1997 sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**:1376-81.
248. **Vaz-Moreira, I., A. Novo, E. Hantsis-Zacharov, A. R. Lopes, M. Gomila, O. C. Nunes, C. M. Manaia, and M. Halpern.** 2011. *Acinetobacter rudis* sp. nov. isolated from raw milk and raw wastewater. *Int J Syst Evol Microbiol*.
249. **Vila, J., M. Navia, J. Ruiz, and C. Casals.** 1997a. Cloning and nucleotide sequence analysis of a gene encoding an OXA-derived beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:2757-9.
250. **Vila, J., J. Ruiz, P. Goni, and T. Jimenez de Anta.** 1997b. Quinolone-resistance mutations in the topoisomerase IV parC gene of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* **39**:757-62.
251. **Vila, J., J. Ruiz, P. Goni, A. Marcos, and T. Jimenez de Anta.** 1995. Mutation in the gyrA gene of quinolone-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* **39**:1201-3.
252. **Villegas, M. V., J. N. Kattan, A. Correa, K. Lolans, A. M. Guzman, N. Woodford, D. Livermore, and J. P. Quinn.** 2007. Dissemination of *Acinetobacter baumannii* clones with OXA-23 Carbapenemase in Colombian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:2001-4.
253. **Visca, P., A. Petrucca, P. De Mori, A. Festa, E. Boumis, A. Antinori, and N. Petrosillo.** 2001. Community-acquired *Acinetobacter radioresistens* bacteremia in an HIV-positive patient. *Emerg Infect Dis* **7**:1032-5.
254. **Voha, C., J. D. Docquier, G. M. Rossolini, and T. Fosse.** 2006. Genetic and biochemical characterization of FUS-1 (OXA-85), a narrow-spectrum class D beta-lactamase from *Fusobacterium nucleatum* subsp. polymorphum. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:2673-9.

255. **Wang, H., P. Guo, H. Sun, Q. Yang, M. Chen, Y. Xu, and Y. Zhu.** 2007. Molecular epidemiology of clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. from Chinese hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:4022-8.
256. **Wisplinghoff, H., T. Bischoff, S. M. Tallent, H. Seifert, R. P. Wenzel, and M. B. Edmond.** 2004. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* **39**:309-17.
257. **Yan, Z. Q., D. X. Shen, J. R. Cao, R. Chen, X. Wei, L. P. Liu, and X. L. Xu.** 2010. Susceptibility patterns and molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains from three military hospitals in China. *Int J Antimicrob Agents* **35**:269-73.
258. **Yang, H. Y., H. J. Lee, J. T. Suh, and K. M. Lee.** 2009. Outbreaks of imipenem resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 beta-lactamase in a tertiary care hospital in Korea. *Yonsei Med J* **50**:764-70.
259. **Yong, D., J. H. Shin, S. Kim, Y. Lim, J. H. Yum, K. Lee, Y. Chong, and A. Bauernfeind.** 2003. High prevalence of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Acinetobacter* spp. in Korea. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:1749-51.
260. **Yoon, J. H., I. G. Kim, and T. K. Oh.** 2007. *Acinetobacter marinus* sp. nov. and *Acinetobacter seohaensis* sp. nov., isolated from sea water of the Yellow Sea in Korea. *J Microbiol Biotechnol* **17**:1743-50.
261. **Yum, J. H., K. Yi, H. Lee, D. Yong, K. Lee, J. M. Kim, G. M. Rossolini, and Y. Chong.** 2002. Molecular characterization of metallo-beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomospecies 3 from Korea: identification of two new integrons carrying the *bla*_{VIM-2} gene cassettes. *J Antimicrob Chemother* **49**:837-40.

ANNEXES

ARTICLE 1

Acinetobacter radioresistens as a Silent Source of Carbapenem Resistance for *Acinetobacter* spp.[∇]

Laurent Poirel,¹ Samy Figueiredo,¹ Vincent Cattoir,¹ Alessandra Carattoli,² and Patrice Nordmann^{1*}

Service de Bactériologie-Virologie, INSERM U914, Emerging Resistance to Antibiotics, Hôpital de Bicêtre, Assistance Publique/Hôpitaux de Paris, Université Paris XI, Le Kremlin-Bicêtre, France,¹ and Department of Infectious, Parasitic and Immune-Mediated Diseases, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy²

Received 10 October 2007/Returned for modification 14 November 2007/Accepted 4 January 2008

Carbapenem resistance results mostly from the expression of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases in *Acinetobacter baumannii*. The *bla*_{OXA-23} oxacillinase gene is increasingly reported worldwide and may represent an emerging threat. Our goal was to identify the progenitor of that carbapenemase gene. A collection of 50 *Acinetobacter* sp. strains corresponding to several *Acinetobacter* species was screened for *bla*_{OXA-23}-like genes by PCR and hybridization techniques. Five *Acinetobacter radioresistens* isolates that were susceptible to carbapenems harbored chromosomally encoded *bla*_{OXA-23}-like genes. A similar plasmid backbone was identified in several *bla*_{OXA-23}-positive *A. baumannii* and *A. radioresistens* isolates, further strengthening the vectors of exchanges for these *bla*_{OXA-23}-like genes. Therefore, *A. radioresistens*, a commensal bacterial species which is identified on the skin of hospitalized and healthy patients (a property shared with *A. baumannii*), was identified as the source of the *bla*_{OXA-23} gene.

Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* is increasingly reported and leads to difficult-to-treat nosocomial infections (25, 28, 33, 38). Carbapenem-hydrolyzing class D β-lactamases (CHDLs) represent the main mechanism of resistance to carbapenems in *Acinetobacter* spp. (4, 25). Three main groups of acquired CHDLs have been identified in *A. baumannii* and are of the OXA-23, OXA-40, and OXA-58 types. These oxacillinases confer reduced susceptibility or resistance to carbapenems once they are expressed in *A. baumannii* (13). Several studies have reported that those oxacillinase genes are encoded by transferable plasmids and likely possess restricted host ranges since attempts to transfer the oxacillinase genes from *A. baumannii* to *Escherichia coli* as the recipient strain failed (3, 13, 32). The β-lactamase OXA-23 (formerly ARI-1) was identified first in Scotland and was found to be a source of transferable resistance to imipenem in *A. baumannii* (10). Since then, OXA-23 producers have been identified as sources of nosocomial outbreaks worldwide, including Brazil, Colombia, the United Kingdom, Korea, Tahiti, and China (6, 9, 19, 23, 40, 42, 44). In addition, OXA-23-producing and carbapenem-resistant *Acinetobacter* sp. isolates have been isolated from soldiers with infections returning from Iraq and are a possible source of further spread in the United States and the United Kingdom (15, 20). The origin (reservoir) of those CHDL genes remains unknown.

Recently, we identified acquired *bla*_{OXA-23} genes located in peculiar transposon structures, namely, Tn2006 (IS*Aba1* linked) and Tn2007 (IS*Aba4* linked) from carbapenem-resistant *A. baumannii* isolates (7). The Tn2006 structure consists of two

copies of the same IS*Aba1* insertion sequence bracketing the *bla*_{OXA-23} gene together with an ATPase-encoding gene (Fig. 1) (7). Transposon Tn2007 contains a single copy of IS*Aba4* associated with the same ATPase-encoding gene located downstream of the *bla*_{OXA-23} gene (7). This ATPase-encoding gene has been identified in 13 of 13 *bla*_{OXA-23}-positive *A. baumannii* isolates studied (7).

Therefore, considering that the *bla*_{OXA-23} gene (i) has mostly been identified in *Acinetobacter* spp., (ii) has a GC content of 38% (which fits with that of the *Acinetobacter* sp. genes [12, 37]), (iii) was associated with a gene encoding an AAA ATPase that shared a high degree of identity with that of another related species (*Acinetobacter baylyi* [1]), and (iv) was likely mobilized by the IS*Aba1* insertion sequence that is widespread in *Acinetobacter* spp. (14, 35), we hypothesized that the *bla*_{OXA-23} gene may originate from a species possibly belonging to the genus *Acinetobacter*. In addition, we hypothesized that the donor of the gene may share the same reservoir as the recipient *A. baumannii* isolate, i.e., the human skin. This prompted us to search for the progenitor of this emerging carbapenemase gene.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and patients. Our screening panel included 50 *Acinetobacter* sp. strains that belonged to 14 different *Acinetobacter* species, including *A. junii*; *A. johnsonii*; *A. haemolyticus*; *A. baylyi*; *A. hwoffii*; *A. radioresistens*; *A. schindleri*; *A. ursingii*; and *Acinetobacter* genomospecies 3, 10, 13, 15, 16, and 17. Those strains were identified to the species level by using molecular techniques, as described by Dortet et al. (11). Reference strain *A. radioresistens* CIP103788 was from a cotton plant from Argentina (24). Four additional *A. radioresistens* strains were from skin and urinary tract specimens of patients from the Hôpital de Bicêtre (data not shown). *bla*_{OXA-23}-positive *A. baumannii* strain Ab13 was used as a control for the molecular experiments and the biochemical assays (7).

Molecular techniques. A PCR-based screening for the *bla*_{OXA-23} gene was performed with primers OXA-IMP1 and OXA-IMP2 (Table 1) (13). The AAA ATPase-encoding gene was amplified with primer ATPaseB3 (Table 1) in combination with primer OXA-IMP1 (13). The screening for insertion sequences IS*Aba1* and IS*Aba4* was performed with primers IS*Aba1A* and IS*Aba1B* and

* Corresponding author. Mailing address: Service de Bactériologie-Virologie, Hôpital de Bicêtre, 78 rue du Général Leclerc, Le Kremlin-Bicêtre 94275, France. Phone: 33-1-45-21-36-32. Fax: 33-1-45-21-63-40. E-mail: nordmann.patrice@bct.aphp.fr.

[∇] Published ahead of print on 14 January 2008.

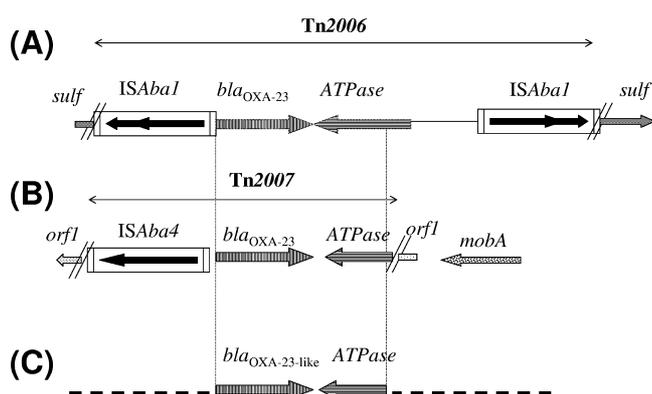


FIG. 1. Schematic maps of composite transposon Tn2006 carrying the *bla*_{OXA-23} gene identified on a plasmid in *A. baumannii* isolates (7) (A) and the sequences identified in the five different *A. radioresistens* isolates (B). The sequences identical between Tn2006, Tn2007, and the *A. radioresistens* isolates are indicated by two vertical lines. *ATPase* is the gene encoding the putative ATPase, and *sulf* is the gene for a plasmid-borne sulfonamide resistance gene truncated by the insertion of Tn2006. *orf1* is the gene encoding a putative protein truncated by the insertion of Tn2007, and *mobA* is the gene encoding a putative mobilization protein. Sequences indicated by dashes are unknown.

primers ISAbA4A and ISAbA4B, respectively (Table 1). The chromosomal location of the *bla*_{OXA-23} gene was demonstrated by using the endonuclease I-Ceu-I technique, as described previously (21). Briefly, analysis of the I-Ceu-I-restricted fragments of whole-cell DNAs of the *A. radioresistens* isolates was performed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and gave five DNA fragments in each case. Then, transfer and Southern hybridization were performed as described previously (29, 34) with DNA probes specific for rRNA, consisting of a 1,504-bp PCR fragment specific for 16S rRNA genes (22) and a 840-bp internal PCR fragment specific for the *bla*_{OXA-23} gene.

Cloning of the entire *bla*_{OXA-23}-like genes (amplified with primers PreOXA-23A and PreOXA-23B [Table 1]) was performed by using kanamycin-resistant plasmid pCR-BluntII-TOPO (Invitrogen, Life Technologies, Cergy-Pontoise, France), and the recombinant plasmids were transferred into *E. coli* TOP10 (Invitrogen). The selection of recombinant clones was done with plates containing kanamycin (30 µg/ml) and amoxicillin (30 µg/ml). The sequences of the cloned fragments were confirmed by double-strand sequencing.

Culture media and susceptibility testing. The *A. baumannii* and *A. radioresistens* strains were grown on Mueller-Hinton agar plates and incubated overnight at 37°C. The MICs of the antibiotics were determined by Etest (AB Biodisk, Solna, Sweden) on Mueller-Hinton agar plates at 37°C. Carbenicillin activities were assayed by UV spectrophotometry with culture extracts of the *A. radioresistens* isolates obtained as described and with 100 µM benzylpenicillin or imipenem as the substrate (31). One unit of activity was defined as the amount of enzyme hydrolyzing 1 µmol of substrate per min per mg of protein.

Plasmid analysis. Since the *repAcI* gene encoding a novel replicase was recently identified from a plasmid carrying the gene encoding another CHDL (OXA-58) from an *A. baumannii* isolate, PCR was used to search for it among the *bla*_{OXA-23}-positive *A. baumannii* isolates and *A. radioresistens* strains by using primers RepAFW and RepARV (Table 1) (3). The specificity of the *repAcI* PCR assay was confirmed by subsequent sequencing of the amplicons obtained from the *A. baumannii* and the *A. radioresistens* strains. The aim of that experiment was to determine whether plasmids circulating in *A. baumannii* could be also identified in *A. radioresistens* and whether they could thus be possible vehicles for gene exchanges between both species.

Nucleotide sequence accession number. The nucleotide sequences of the *bla*_{OXA-23}-like genes from *A. radioresistens* have been deposited in the GenBank database under accession number EU131372.

RESULTS

Identification of progenitor. A preliminary PCR screening gave a *bla*_{OXA-23}-positive result only for *A. radioresistens* strain CIP103788 (renamed strain 1 in this study), as it was the single representative of that species among the 50 isolates corresponding to the 14 *Acinetobacter* species tested. Additional PCRs were subsequently performed with four *A. radioresistens* clinical isolates (strains 2 to 5). These isolates also gave positive results; and sequencing identified an identical *bla*_{OXA-23} gene in two cases (strains 3 and 5) and very closely related genes, namely, *bla*_{OXA-103}, *bla*_{OXA-102}, and *bla*_{OXA-105}, in strains 1, 2, and 4, respectively. Those variants had up to six amino acid substitutions compared to the sequence of β-lactamase OXA-23 (Fig. 2).

Analysis of I-CeuI-restricted fragments by PFGE followed by their hybridization showed that the *A. radioresistens* strains gave a single fragment that cohybridized with both 16S RNA- and *bla*_{OXA-23}-specific probes, demonstrating that the *bla*_{OXA-23}-like genes were located on the chromosome (Fig. 3). PCR mapping indicated that the gene coding for a putative ATPase and located downstream of the acquired *bla*_{OXA-23} gene (and part of Tn2006 and Tn2007) in *A. baumannii* was also identified at the exact same downstream position in all five *A. radioresistens* strains. The corresponding proteins also displayed high degrees of amino acid identity (more than 98% amino acid identity, with no more than four nucleotide substitutions in the gene). A PCR screening of the five *A. radioresistens* strains for ISAbal- or ISAbal4-like elements gave negative results, indicating that *A. radioresistens* was not a reservoir for these insertion sequence elements involved in the mobilization of *bla*_{OXA-23}.

TABLE 1. Sequences of primers used in the study

Primer name	Primer sequence (5' to 3')	Location, direction
PreOXA-23A	TTTCTATTSATCTGGTGTITA	<i>bla</i> _{OXA-23} gene, forward external primer
PreOXA-23B	TTAGAGGTTTCTGTCAAGCTC	<i>bla</i> _{OXA-23} gene, reverse external primer
ATPaseB3	GCTTCATCCAGAAGCGTCCGG	ATPase gene, reverse primer
ISAbalA	ATGCAGCGCTTCTTTGCCAGG	<i>tmpA</i> gene of ISAbal, forward primer
ISAbalB	AATGATTGGTGACAATGAAG	<i>tmpA</i> gene of ISAbal, reverse primer
ISAbal4A	ATTTGAACCCATCTATGGC	<i>tmpA</i> gene of ISAbal4, forward primer
ISAbal4B	ACTCTCATATTTTTTCTT	<i>tmpA</i> gene of ISAbal4, reverse primer
RepAFW	GAGAGATTTAGTTGTAAAGGACAATGC	<i>repAcI</i> gene, forward primer
RepARV	CGACTCATAACATTTCCGGATATCCCATTA	<i>repAcI</i> gene, reverse primer
OXA-IMP1	GCAAAATAMAGAATATGTSCC ^a	<i>bla</i> _{OXA-23} and <i>bla</i> _{OXA-40} genes, forward internal primer
OXA-IMP2	CTCMACCCARCCRGTCACCC ^b	<i>bla</i> _{OXA-23} and <i>bla</i> _{OXA-40} genes, reverse internal primer

^a M is A or C, and S is G or C.

^b M is A or C, and R is A or G.



FIG. 2. Comparison of the amino acid sequences of the OXA-23-like determinants. OXA-23 is from *A. radioresistens* isolates 3 and 5, OXA-102 is from isolate 1, OXA-103 is from isolate 2, and OXA-105 is from isolate 4. Dashes indicate identical amino acid residues, and the critical motifs for CHDLs are shaded in gray. The numbering is according to the nomenclature for CHDLs (8).

Susceptibility patterns. Antibiotic susceptibility testing showed that the five *A. radioresistens* were fully susceptible to all antibiotics tested, including penicillins and carbapenems. It is therefore likely that the *bla*_{OXA-23}-like genes were not expressed (or were expressed at a very low level) in their host (data not shown).

Catalytic properties of OXA-23-like oxacillinases. In order to assess whether the *A. radioresistens* isolates expressed any carbapenemase activity, the β -lactamase activities were determined by using crude enzyme extracts of the cultures of each isolate. No hydrolysis was detected with any of these extracts obtained from the *A. radioresistens* strains with either benzylpenicillin or imipenem as the substrate, whereas the hydrolysis rates for *A. baumannii* Ab13 producing OXA-23 obtained with those two substrates were 5 and 0.2 U/mg of protein, respectively. This result further indicated a very weak expression of those naturally occurring *bla*_{OXA-23}-like genes in *A. radioresistens*. In order to evaluate the hydrolysis profile of the newly identified OXA-23-like β -lactamases, the *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-102}, *bla*_{OXA-103}, and *bla*_{OXA-105} genes were cloned into the same plasmid vector and expressed in *E. coli* under the control of the same promoter. The MICs of the β -lactams were very similar, with a slight variability of the MICs of the carbapenems (Table 2). Three- to fourfold increases in the MICs of ertapenem and meropenem were detected for OXA-102, OXA-103, and OXA-105 producers compared to the MICs for the OXA-23 producers. Further detailed kinetic analysis would be necessary to analyze those catalytic properties.

Plasmid analysis. The *repAci1* gene, which encodes a replicase, was recently identified as part of the replication control system of plasmids carrying *bla*_{OXA-58} (another acquired

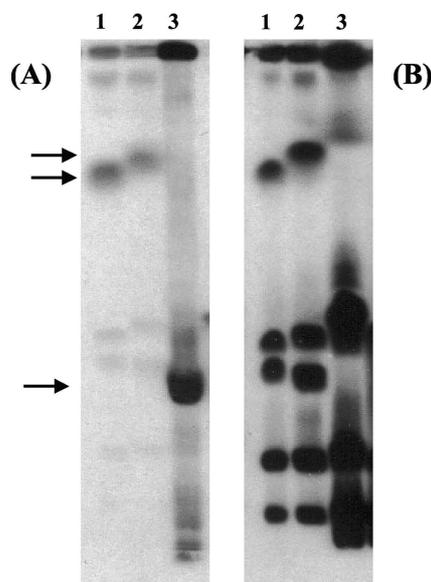


FIG. 3. PFGE profiles of I-Ceu-I digested whole-cell DNAs of *A. radioresistens* strains. Lanes 1, *A. radioresistens* reference strain 1; lanes 2, *A. radioresistens* clinical isolate 2; lanes 3, *A. baumannii* Ab13 isolate harboring a plasmid-located *bla*_{OXA-23} gene. Southern hybridization was performed with an internal probe specific for the *bla*_{OXA-23} gene (A) and with a probe specific for the 16S-23S rRNA gene (B). Horizontal arrows indicate the positions of hybridization with the *bla*_{OXA-23} probe. By comparison of the two hybridization patterns, cohybridizations were obtained for strains 1 and 2 (chromosomal location of *bla*_{OXA-23}), whereas the *bla*_{OXA-23}-positive signal obtained for *A. baumannii* Ab13 has no corresponding band with the 16S-23S rRNA-specific probe.

TABLE 2. MICs of carbapenems for the *E. coli* TOP10 recombinant strains expressing OXA-23, OXA-102, OXA-103, and OXA-105 and reference strain *E. coli* TOP10

Antibiotic	MIC (μ g/ml)				
	<i>E. coli</i> TOP10 (pOXA-23)	<i>E. coli</i> TOP10 (pOXA-102)	<i>E. coli</i> TOP10 (pOXA-103)	<i>E. coli</i> TOP10 (pOXA-105)	<i>E. coli</i> TOP10
Imipenem	1	1	1	1	0.125
Meropenem	0.047	0.094	0.094	0.094	0.047
Ertapenem	0.012	0.125	0.125	0.125	0.004

CHDL-encoding gene from *A. baumannii*) (3). The *bla*_{OXA-23}-positive *A. baumannii* and *A. radioresistens* strains were evaluated to determine whether they carry plasmids with the *repAciI* gene. These *repAciI*-positive plasmids may have a restricted host range since they did not replicate in members of the family *Enterobacteriaceae* (3, 13, 32). Our hypothesis was that this plasmid type could be also the vehicle for the dissemination of *bla*_{OXA-23} and may thus be present in *A. baumannii* as the recipient and possibly in *A. radioresistens* as the donor. A preliminary screening of 15 *bla*_{OXA-23}-positive *A. baumannii* isolates collected worldwide showed that the *repAciI* plasmids were identified in eight of these isolates, which in some cases also harbored the *bla*_{OXA-23} gene (unpublished data). A similar screening performed with the *A. radioresistens* strains analyzed in this study identified *repAciI* plasmids in a single strain. Thus, plasmids with an identical origin of replication were identified in *A. radioresistens* and *A. baumannii*.

DISCUSSION

We found in the present study that *A. radioresistens* is the progenitor of the *bla*_{OXA-23}-like genes currently emerging as the sources of carbapenem resistance in *A. baumannii* worldwide. This statement is based on the identification on the *A. radioresistens* chromosome of genes encoding both OXA-23-like and ATPase-like enzymes, with those genes being located near each other. The way in which the *bla*_{OXA-23} gene has been mobilized from *A. radioresistens* and has disseminated to *A. baumannii* might correspond to the following model. A plasmid-mediated IS*AbaI* element originating from *A. baumannii* may enter *A. radioresistens* and then transpose and target the regions upstream and downstream of the chromosomal *bla*_{OXA-23}-like gene, thus forming a transposon-like structure and also enhancing the expression of the *bla*_{OXA-23}-like gene. This structure may then transpose and target a plasmid inside the *A. radioresistens* genome, and finally, this plasmid conjugates into *A. baumannii*, thus spreading the resistance determinant in the latter species.

A. radioresistens is a commensal species of the skin of healthy individuals (2, 36) and hospitalized patients (36, 43). The virulence role of that bacterium may be limited, since only one case of bacteremia has been reported so far and occurred in a human immunodeficiency virus-positive immunodepressed patient (41). However, the precise identification of *Acinetobacter* sp. isolates at the species level is not easy, and the use of molecular tools is required for unambiguous identification. It could therefore be possible that the true pathogenic trait of *A. radioresistens* might be underestimated, with many *Acinetobacter* sp.-related infections actually being due to *A. radioresistens*.

The *A. radioresistens* isolates studied were fully susceptible to β -lactams, indicating that the *bla*_{OXA-23}-like genes are likely poorly expressed from their original hosts. This indicates, as underlined by Iredell and Sintchenko (17), that the control of the reservoir of resistance genes might be more complex than expected. The source of the resistance gene may remain hidden, since it is located in a bacterial species that is not searched for in hospital settings and that is known to be highly resistant to desiccation and radiation (5, 18).

It is possible that genetic exchange between the progenitor

(*A. radioresistens*) and its recipient of clinical relevance (*A. baumannii*), which leads to carbapenem resistance in the latter species, may have occurred in humans. Taking into account the fact that both *A. baumannii* and *A. radioresistens* are identified on the human skin, especially in hospitalized patients, it is possible that *bla*_{OXA-23} gene exchange may occur at that location (2, 36).

A. radioresistens may be more prevalent than expected in the hospital environment, since it has been identified as the most common *Acinetobacter* species in hospital environmental samples (43). The identification of same plasmid types in *A. radioresistens* and *A. baumannii* further strengthens the possibility of gene exchange between those two species.

This study identified the source of an acquired and clinically relevant resistance gene. The unambiguous identification of the reservoir (origin) of an acquired resistance gene, such as *bla*_{SHV} from *Klebsiella pneumoniae* (39), the emerging *bla*_{CTX-M}-like genes from *Kluyvera ascorbata* and *Kluyvera georgiana* (16, 27), the plasmid-mediated cephalosporinase genes from several gram-negative species (26), and the plasmid-mediated *qnrA* gene from *Shewanella algae* (30), has very rarely been reported. Our findings further emphasize the possible role of the hospital environment as a reservoir of antibiotic resistance genes and a place where gene exchange may occur. The future control of multidrug resistance may necessitate identification of not only the multidrug-resistant isolates but also their reservoirs by molecular-based techniques.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by a grant from the Ministère de l'Éducation Nationale et de la Recherche (grant UPRES-EA3539), Université Paris XI, Paris, France, and mostly by a grant from the European Community (6th PCRD, grant LSHM-CT-2005-018705). S.F. was funded by a grant-in-aid from the Fondation pour la Recherche Médicale, Paris, France.

REFERENCES

- Barbe, V., D. Vallenet, N. Fonknechten, A. Kreimeyer, S. Oztas, L. Labarre, S. Cruveiller, C. Robert, S. Duprat, P. Wincker, L. N. Ornston, J. Weissenbach, P. Marliere, G. N. Cohen, and C. Medigue. 2004. Unique features revealed by the genome sequence of *Acinetobacter* sp. ADP1, a versatile and naturally transformation competent bacterium. *Nucleic Acids Res.* **32**:5766–5779.
- Berlau, J., H. Aucken, H. Malnick, and T. Pitt. 1999. Distribution of *Acinetobacter* species on skin of healthy humans. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **18**:179–183.
- Bertini, A., L. Poirel, S. Bernabeu, D. Fortini, L. Villa, P. Nordmann, and A. Carattoli. 2007. Multicopy *bla*_{OXA-58} gene as a source of high-level resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:2324–2328.
- Bonomo, R. A., and D. Szabo. 2006. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin. Infect. Dis.* **43**(Suppl. 2): S49–S56.
- Christensen, E. A., P. Gerner-Smidt, and H. Kristensen. 1991. Radiation resistance of clinical *Acinetobacter* spp.: a need for concern? *J. Hosp. Infect.* **18**:85–92.
- Coelho, J. M., J. F. Turton, M. E. Kaufmann, J. Glover, N. Woodford, M. Warner, M. F. Palepou, R. Pike, T. L. Pike, B. C. Patel, and D. M. Livermore. 2006. Occurrence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clones at multiple hospitals in London and southeast England. *J. Clin. Microbiol.* **44**:3623–3627.
- Corvec, S., L. Poirel, T. Naas, H. Drugeon, and P. Nordmann. 2007. Genetics and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene *bla*_{OXA-23} in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:1530–1533.
- Couture, F., J. Lachapelle, and R. C. Lévesque. 1992. Phylogeny of LCR-1 and OXA-5 with class A and class D β -lactamases. *Mol. Microbiol.* **6**:1693–1705.
- Dalla-Costa, L. M., J. M. Coelho, H. A. Souza, M. E. Castro, C. J. Stier, K. L. Bragagnolo, A. Rea-Neto, S. R. Pentead-Filho, D. M. Livermore, and N.

- Woodford. 2003. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. *J. Clin. Microbiol.* **41**:3403–3406.
10. Donald, H. M., W. Scaife, S. G. Amyes, and H. K. Young. 2000. Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA β -lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:196–199.
 11. Dortet, L., P. Legrand, C. J. Soussy, and V. Cattoir. 2006. Bacterial identification, clinical significance, and antimicrobial susceptibilities of *Acinetobacter ursingii* and *Acinetobacter schindleri*, two frequently misidentified opportunistic pathogens. *J. Clin. Microbiol.* **44**:4471–4478.
 12. Fournier, P. E., D. Vallenet, V. Barbe, S. Audic, H. Ogata, L. Poirel, H. Richet, C. Robert, S. Mangenot, C. Abergel, P. Nordmann, J. Weissenbach, D. Raoult, and J. M. Claverie. 2006. Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Genet.* **2**:e7.
 13. Héritier, C., L. Poirel, T. Lambert, and P. Nordmann. 2005. Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:3198–3202.
 14. Héritier, C., L. Poirel, and P. Nordmann. 2006. Cephalosporinase overexpression resulting from insertion of *ISAbal* in *Acinetobacter baumannii*. *Clin. Microbiol. Infect.* **12**:123–130.
 15. Hujer, K. M., A. M. Hujer, E. A. Hulten, S. Bajaksouzian, J. M. Adams, C. J. Donskey, D. J. Ecker, C. Massire, M. W. Eshoo, R. Sampath, J. M. Thomson, P. N. Rather, D. W. Craft, J. T. Fishbai, A. J. Ewell, M. R. Jacobs, D. L. Paterson, and R. A. Bonomo. 2006. Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter* sp. isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:4114–4123.
 16. Humeniuk, C., G. Arlet, V. Gautier, P. Grimont, R. Labia, and A. Philippon. 2002. β -Lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:3045–3049.
 17. Iredell, J. R., and V. Sintchenko. 2006. Screening for antibiotic resistant gram-negative bacteria. *Lancet Infect. Dis.* **6**:316–317.
 18. Jawad, A., A. M. Snelling, J. Heritage, and P. M. Hawkey. 1998. Exceptional desiccation tolerance of *Acinetobacter radioresistens*. *J. Hosp. Infect.* **39**:235–240.
 19. Jeong, S. H., I. K. Bae, K. O. Park, Y. J. An, S. G. Sohn, S. J. Jang, K. H. Sung, K. S. Yang, K. Lee, D. Young, and S. H. Lee. 2006. Outbreaks of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing carbapenemases in Korea. *J. Microbiol.* **44**:423–431.
 20. Jones, A., D. Morgan, A. Walsh, J. Turton, D. Livermore, T. Pitt, A. Green, M. Gill, and D. Mortiboy. 2006. Importation of multidrug-resistant *Acinetobacter* spp. infections with casualties from Iraq. *Lancet Infect. Dis.* **6**:317–318.
 21. Liu, S. L., A. Hessel, and K. E. Sanderson. 1993. Genomic mapping with I-Ceu-I, an intron-encoded endonuclease specific for genes for ribosomal RNA in *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, and other bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:6874–6878.
 22. Mammeri, H., L. Poirel, N. Mangeney, and P. Nordmann. 2003. Chromosomal integration of a cephalosporinase gene from *Acinetobacter baumannii* into *Oligella wethralis* as a source of acquired resistance to β -lactams. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:1536–1542.
 23. Naas, T., M. Levy, C. Hirschauer, H. Marchandin, and P. Nordmann. 2005. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-23 in a tertiary care hospital of Papeete, French Polynesia. *J. Clin. Microbiol.* **43**:4826–4829.
 24. Nishimura, Y., H. Kanzaki, and H. Izuka. 1988. Taxonomic studies of *Acinetobacter* species on the electrophoretic analysis of enzymes. *J. Basic Microbiol.* **28**:363–370.
 25. Perez, F., A. M. Hujer, K. M. Hujer, B. K. Decker, P. N. Rather, and R. A. Bonomo. 2007. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:3471–3484.
 26. Philippon, A., G. Arlet, and G. A. Jacoby. 2002. Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:1–11.
 27. Poirel, L., P. Kämpfer, and P. Nordmann. 2002. Chromosome-encoded Ambler class A β -lactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:4038–4040.
 28. Poirel, L., and P. Nordmann. 2006. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.* **12**:826–836.
 29. Poirel, L., O. Menuteau, N. Agoli, C. Cattoen, and P. Nordmann. 2003. Outbreak of extended-spectrum β -lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. *J. Clin. Microbiol.* **41**:3542–3547.
 30. Poirel, L., J. M. Rodriguez-Martinez, H. Mammeri, A. Liard, and P. Nordmann. 2005. Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:3523–3525.
 31. Poirel, L., M. Guibert, D. Girlich, T. Naas, and P. Nordmann. 1999. Cloning, sequence analyses, expression, and distribution of *ampC-ampR* from *Morganella morganii* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:769–776.
 32. Poirel, L., S. Marqué, C. Héritier, C. Segonds, G. Chabanon, and P. Nordmann. 2005. OXA-58, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:202–208.
 33. Quale, J., S. Bratu, D. Landman, and R. Heddurshetti. 2003. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* endemic in New York City. *Clin. Infect. Dis.* **37**:214–220.
 34. Sambrook, J., and D. W. Russell. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
 35. Segal, H., S. Garry, and B. G. Elisha. 2005. Is *ISAbal* customized for *Acinetobacter*? *FEMS Microbiol. Lett.* **243**:425–429.
 36. Seifert, H., L. Dijkshoorn, P. Gerner-Smidt, N. Pelzer, I. Tjernberg, and M. Vaneechoutte. 1997. Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *J. Clin. Microbiol.* **35**:2819–2825.
 37. Smith, M. G., T. A. Gianoulis, S. Pukatzki, J. J. Mekalanos, L. N. Ornston, M. Gerstein, and M. Snyder. 2007. New insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis. *Genes Dev.* **21**:601–614.
 38. Thomson, J. M., and R. A. Bonomo. 2005. The threat of antibiotic resistance in gram-negative pathogenic bacteria: β -lactams in peril! *Curr. Opin. Microbiol.* **8**:518–524.
 39. Tzouveleki, L. S., and R. A. Bonomo. 1999. SHV-type β -lactamases. *Curr. Pharm. Des.* **5**:847–864.
 40. Villegas, M. V., J. N. Kattan, A. Correa, K. Lolans, A. M. Guzman, N. Woodford, D. Livermore, and J. P. Quinn. 2007. Dissemination of *Acinetobacter baumannii* clones with OXA-23 carbapenemase in Colombian hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:2001–2004.
 41. Visca, P., A. Petrucca, P. De Mori, A. Festa, E. Boumis, A. Antinori, and N. Petrosillo. 2001. Community-acquired *Acinetobacter radioresistens* bacteremia in an HIV-positive patient. *Emerg. Infect. Dis.* **7**:1032–1035.
 42. Wang, H., P. Guo, H. Sun, H. Wang, Q. Yang, M. Chen, Y. Xu, and Y. Zhu. 2007. Molecular epidemiology of clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. from Chinese hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:4022–4028.
 43. Webster, C. A., M. Crowe, H. Humphreys, and K. J. Towner. 1998. Surveillance of an adult intensive care unit for long-term persistence of a multi-resistant strain of *Acinetobacter baumannii*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect.* **17**:171–176.
 44. Zhou, H., B. R. Pi, Q. Yang, Y. S. Yu, Y. G. Chen, L. J. Li, and S. S. Zheng. 2007. Dissemination of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains carrying the *ISAbal bla_{OXA-23}* genes in a Chinese hospital. *J. Med. Microbiol.* **56**:1076–1080.

ARTICLE 2

OXA-134, a Naturally Occurring Carbapenem-Hydrolyzing Class D β -Lactamase from *Acinetobacter lwoffii*[∇]

Samy Figueiredo,^{1,2} Laurent Poirel,^{1*} Harald Seifert,³ Pauline Mugnier,¹
 Dan Benhamou,² and Patrice Nordmann¹

Service de Bactériologie-Virologie, INSERM U914, Emerging Resistance to Antibiotics,¹ and Département Anesthésie-Réanimation,²
 Hôpital de Bicêtre, Assistance Publique/Hôpitaux de Paris, Faculté de Médecine et Université Paris-Sud, 94275 Le Kremlin-Bicêtre,
 France, and Institute for Microbiology, Immunology and Hygiene, University of Cologne, Cologne, Germany³

Received 7 May 2010/Returned for modification 21 July 2010/Accepted 1 September 2010

***Acinetobacter lwoffii*, a species whose natural habitat is the human skin, intrinsically possesses a chromosomal gene encoding a carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase, OXA-134. This species may therefore constitute a reservoir for carbapenemase genes that may spread among other *Acinetobacter* species.**

Acinetobacter baumannii, the most common *Acinetobacter* species isolated from humans, is an opportunistic pathogen for which resistance to carbapenems is increasing worldwide (13–15). Carbapenem resistance in *A. baumannii* is associated mostly with acquired carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamases (CHDLs) (19). Four groups of acquired CHDLs in *A. baumannii*, OXA-23, OXA-40, OXA-58, and OXA-143, have been identified (9, 18). In addition, *A. baumannii* possesses a

naturally occurring *bla*_{OXA-51} or *bla*_{OXA-69} CHDL-encoding gene that reduces the efficacy of carbapenems when it is over-expressed (4, 5, 7, 22). Identification of the sources of acquired and clinically relevant CHDLs is important to better understand the way and the reason why these resistance determinants are spreading. *Acinetobacter radioresistens* has recently been identified as the natural carrier of *bla*_{OXA-23}, a gene encoding one of the most commonly acquired CHDLs in *A.*

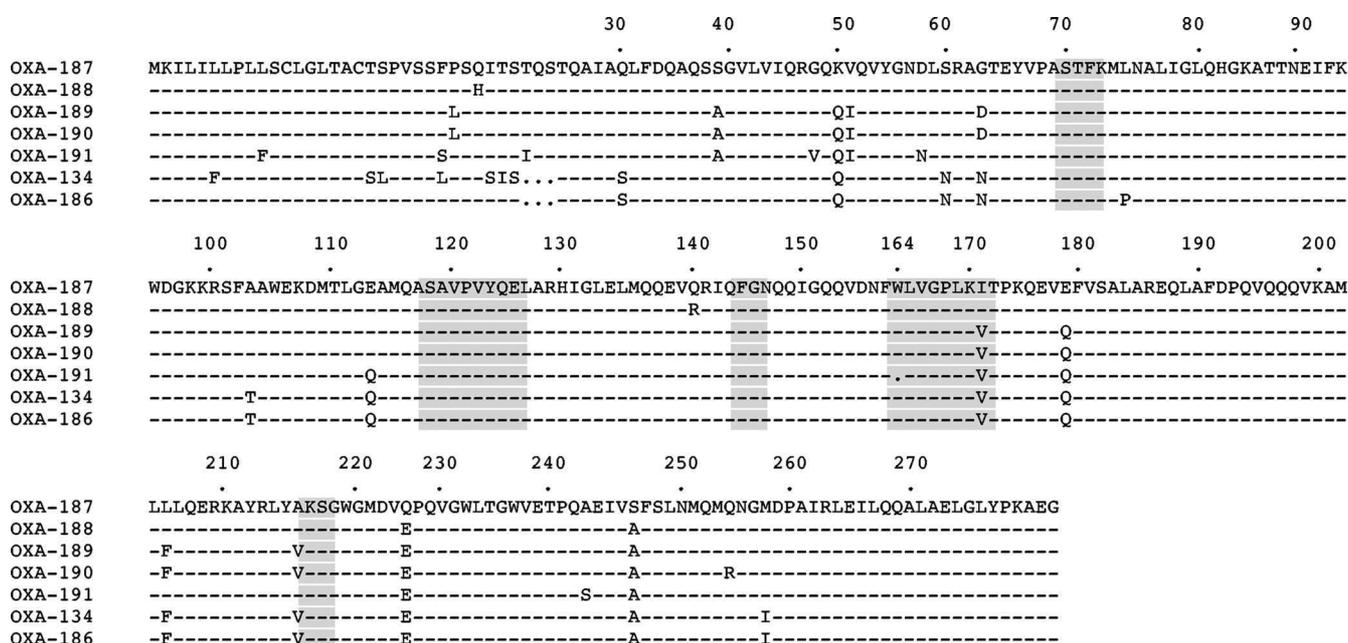


FIG. 1. Amino acid alignment of the seven OXA-134-like class D β -lactamases identified in this study. Dashes indicate amino acids identical to those in the OXA-187 sequence. Amino acid motifs which are well conserved (even if possibly variable) among class D β -lactamases are shaded in gray. Numbering is according to DBL numbering (2).

* Corresponding author. Mailing address: Service de Bactériologie-Virologie, INSERM U914, Emerging Resistance to Antibiotics, Hôpital de Bicêtre, 78 rue du General Leclerc, 94275 Le Kremlin-Bicêtre, France. Phone: 33 1 45 21 36 24. Fax: 33 1 45 21 63 40. E-mail: laurent.poirel@bct.aphp.fr.

[∇] Published ahead of print on 13 September 2010.

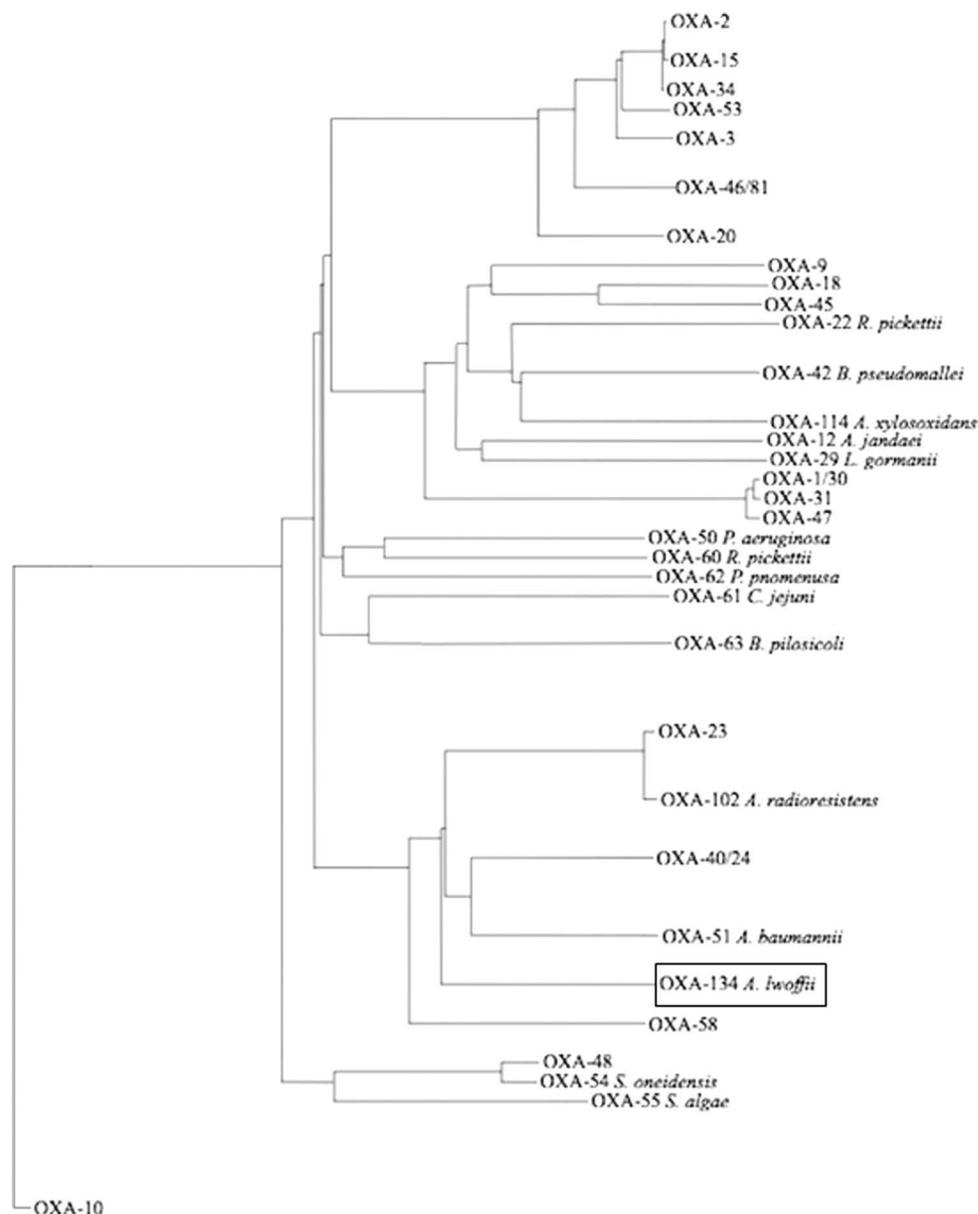


FIG. 2. Dendrogram obtained for 32 class D β -lactamases by neighbor-joining analysis. The alignment used for tree calculation was performed with ClustalX. Branch lengths are drawn to scale and are proportional to the number of amino acid changes. The distance along the vertical axis has no significance. The different clusters identified allowed the identification of nine main groups, considering that proteins from the same group have more than 80% amino acid identity. The class D β -lactamases which are considered to be naturally occurring are indicated together with the names of the corresponding species. *R. pickettii*, *Ralstonia pickettii*; *B. pseudomallei*, *Burkholderia pseudomallei*; *A. xylosoxidans*, *Alcaligenes xylosoxidans*; *A. jandaiei*, *Aeromonas jandaiei*; *L. gormanii*, *Legionella gormanii*; *P. aeruginosa*, *Pseudomonas aeruginosa*; *P. pnomenusa*, *Pandoraea pnomenusa*; *C. jejuni*, *Campylobacter jejuni*; *B. pilosicoli*, *Brachyspira pilosicoli*; *S. oneidensis*, *Shewanella oneidensis*; *S. algae*, *Shewanella algae*.

baumannii (16). However, the progenitors of the other acquired CHDLs identified in *Acinetobacter* species remain unknown. Our study aimed to evaluate whether other *Acinetobacter* species may represent additional reservoirs of CHDL-encoding genes.

The screening panel included strains belonging to 23 *Acinetobacter* species, including *A. junii*, *A. johnsonii*, *A. haemolyticus*, *A. baylyi*, *A. lwoffii*, *A. radioresistens*, *A. schindleri*, *A. ursingii*, *A. calcoaceticus*, *A. gernerii*, *A. tjernbergiae*, *A. bouvetii*, *A. tandoii*, *A. grimontii*, *A. townneri*, *A. parvus*, and *Acinetobacter*

genomespecies 3, 6, 9, 10, 13, 15, 16, and 17. *Acinetobacter* genomespecies 9 is now classified as *A. lwoffii* (15). Strains were identified at the species level by using 16S rRNA sequencing (3). Susceptibility testing was analyzed by the disk diffusion method in accordance with the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute (1), and MICs were determined by using Etest strips (AB bioMérieux, Solna, Sweden).

Screening for the known CHDL-encoding *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-40}, *bla*_{OXA-58}, and *bla*_{OXA-143} genes was performed by

TABLE 1. MICs of β -lactams for the different *A. lwoffii* isolates, *E. coli* TOP10 harboring recombinant plasmid pOXA-134, and the *E. coli* TOP10 reference strain

β -Lactam(s) ^a	MIC (μ g/ml) for:		
	<i>A. lwoffii</i> isolates	<i>E. coli</i> TOP10(pOXA-134)	<i>E. coli</i> TOP10
Amoxicillin	0.5–1	>512	4
Amoxicillin + CLA	0.5–1	128	4
Ticarcillin	0.5–1	>512	4
Ticarcillin + CLA	0.5–1	256	4
Piperacillin	1.5–4	8	1
Piperacillin + TZB	1.5–4	8	1
Cephalothin	4–8	8	2
Cefuroxime	4–8	4	2
Ceftazidime	1–4	0.12	0.06
Cefotaxime	0.75–3	0.12	0.12
Cefepime	0.25–1	0.12	0.06
Moxalactam	1–4	0.12	0.06
Aztreonam	4–8	0.12	0.12
Imipenem	0.12–0.5	0.5	0.06
Meropenem	0.12–0.5	0.5	0.06

^a CLA, clavulanic acid at a fixed concentration of 4 μ g/ml; TZB, tazobactam at a fixed concentration of 4 μ g/ml.

PCR using internal primers (8, 9). This screening was positive only for the *bla*_{OXA-23} gene and only for *A. radioresistens* strain 3 and *A. lwoffii* strain 1. After sequencing, *A. radioresistens* strain 3 was found to possess the *bla*_{OXA-23} gene, in accordance with previous results (16). Sequencing of the amplicon obtained from *A. lwoffii* strain 1 identified a gene encoding a novel OXA-type β -lactamase. Thermal asymmetric interlaced (TAIL) PCR experiments were performed in order to obtain the entire sequence of this gene (11, 12). It encoded a 273-amino-acid protein named OXA-134 that shared 63, 58, 57, and 53% amino acid identity with OXA-23, OXA-40, OXA-51, and OXA-58, respectively. OXA-134 possessed the typical features of a class D β -lactamase, including the STFK tetrad at positions 70 to 73 according to class D β -lactamase (DBL) numbering (Fig. 1) (2). Also, as observed for other CHDLs (except for OXA-58), an FGN motif at DBL positions 144 to 146 replaced the usual YGN motif of classical class D β -lactamases (18). Finally, a KSG element was identified at DBL positions 216 to 218, as observed in the CHDLs OXA-40 and OXA-51, whereas a KTG motif is present in most class D β -lactamases, including the CHDLs OXA-23 and OXA-58 (18). A phylogenetic analysis showed that OXA-134-like β -lactamases were constituting a separate subgroup of CHDLs but that this subgroup was more closely related to the identified class D β -lactamases from *Acinetobacter* spp. than to other known CHDLs (Fig. 2).

A. lwoffii is a commensal organism found on human skin, the perineum, and the oropharynx. It has been associated with catheter-related bloodstream infections in immunocompromised patients and with bacteremia associated with community-acquired gastroenteritis and gastritis (20, 21). All the *Acinetobacter* genomospecies 9/*A. lwoffii* isolates we included in our study were fully susceptible to all antibiotics tested, including penicillins, imipenem, and meropenem. It is therefore likely that the *bla*_{OXA-134}-like genes were not expressed (or were expressed at an insignificant level) in these hosts.

In order to study the biochemical properties of OXA-134,

TABLE 2. Kinetic parameters for purified β -lactamase OXA-134^a

Substrate	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μ M)	k_{cat}/K_m ratio (s ⁻¹ · mM ⁻¹)
Benzylpenicillin	70	50	1,400
Ampicillin	150	250	600
Ticarcillin	0.2	200	1
Piperacillin	30	200	150
Ceftazidime	<0.01	ND ^b	
Cefotaxime	<0.01	ND	
Cefepime	<0.01	ND	
Cefoxitin	<0.01	ND	
Aztreonam	<0.01	ND	
Imipenem	0.1	10	10
Meropenem	0.05	250	0.2

^a Data are means of results from three independent experiments. Standard deviations were within 10% of the means.

^b ND, no detectable hydrolysis (<0.01 s⁻¹).

cloning of the *bla*_{OXA-134} gene into the kanamycin-resistant plasmid pCR-BluntII-TOPO (Invitrogen, Life Technologies, Cergy-Pontoise, France) was performed using PCR products generated with primers PreOXA-134A (5'-GAAAAATGACC AAAATTTGATCG-3') and PreOXA-134B (5'-TATTTGCA TCATCCTTCAGC-3') as described previously (16). *Escherichia coli* TOP10(pOXA-134) showed reduced susceptibility to imipenem and meropenem and resistance to most penicillins that was not inhibited by β -lactamase inhibitors (Table 1).

To further characterize the activity of OXA-134, the enzyme was purified from *E. coli* cultures containing recombinant plasmid pOXA-134 as described previously (17). After DNase treatment and ultracentrifugation at 40,000 \times g for 1 h, the extract was loaded successively onto two Q-Sepharose columns with 20 mM diethanolamine (pH 8.5) and 20 mM diethanolamine (pH 9.5) buffers. The specific activity of the purified β -lactamase OXA-134, measured with 100 μ M imipenem as the substrate, was 116 U · mg of protein⁻¹, with a 20-fold purification factor. The kinetic measurements of the purified enzymes were carried out at 25°C in 50 mM sodium phosphate (pH 7.0), and K_m and k_{cat} values were determined as described previously (6). β -Lactamase OXA-134 showed a narrow-spectrum hydrolysis profile, including mostly penicillins (Table 2). The rates of imipenem and meropenem hydrolysis were low, whereas the MICs of both carbapenems for *E. coli* TOP10 expressing OXA-134 were increased by 3-fold (Table 1). Overall, the catalytic activities obtained for OXA-134 were similar to those for OXA-58 and OXA-40, taken as references for CHDL activity (17).

In order to assess whether the *bla*_{OXA-134}-like gene was naturally present in *A. lwoffii*, a *bla*_{OXA-134}-specific PCR was performed using whole-cell DNA samples from a collection of 10 *A. lwoffii* isolates recovered from clinical specimens, including blood cultures, urine samples, cerebrospinal fluids, and central venous catheter tips, from Bicêtre and Cologne hospitals. PCR results showed that all strains possessed a *bla*_{OXA-134}-like gene. Sequencing of the amplicons allowed the identification of six additional OXA-134 derivatives (named OXA-186 to OXA-191) (see www.lahey.org/Studies) differing by 3 to 18 amino acid substitutions (Fig. 1). Noteworthy, OXA-134 and OXA-186 each possessed 273 amino acids whereas the five other variants each possessed an additional

3-amino-acid stretch (Fig. 1). In three isolates, the *bla*_{OXA-134}-like gene was disrupted by nucleotide substitutions located in the center of the gene and likely leading to interruption of the open reading frame (data not shown). In order to evaluate whether an OXA-134-like variant possessing additional amino acids may confer a different β -lactam resistance pattern, the *bla*_{OXA-187} gene chosen as a representative was cloned and expressed in the same manner as the *bla*_{OXA-134} gene. MICs of β -lactams for *E. coli*(pOXA-187) were similar to those for *E. coli*(pOXA-134) (data not shown), showing that those additional amino acids did not play any significant role in hydrolysis. The chromosomal locations of the *bla*_{OXA-134}-like genes in these *A. lwoffii* isolates were confirmed by using the endonuclease I-CeuI technique, as described previously (10).

In order to evaluate whether *bla*_{OXA-134}-like genes might have disseminated among *A. baumannii* strains, a collection of 100 *A. baumannii* isolates (with variable susceptibilities to imipenem, including 50 carbapenem-resistant isolates) were screened by PCR. None of the screened *A. baumannii* isolates harbored a *bla*_{OXA-134}-like gene.

A. lwoffii was found to be a reservoir of a novel type of CHDL-encoding gene. Detection of that β -lactamase gene might be used as a tool for rapid and accurate identification of the *A. lwoffii* species.

Nucleotide sequence accession number. The nucleotide sequence of the *bla*_{OXA-134} gene described in this work is available in the GenBank nucleotide database under accession number HQ122933.

This work was funded by the INSERM (U914), by a grant from the Ministère de l'Éducation Nationale et de la Recherche (UPRES-EA3539), Université Paris XI, Paris, France, and mostly by a grant from the European Community (TROCAR HEALTH-F3-2008-223031). S.F. was funded by a grant-in-aid from the Fond d'Études et de Recherche du Corps Médical des Hôpitaux de Paris. The contribution of H.S. was supported by a grant from the Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), Germany, Klinische Forschergruppe Infektiologie (BMBF grant 01KI0771).

We thank G. Jacoby, who provided us with the OXA numbering, and T. Naas for precious advice.

REFERENCES

1. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2010. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI M100-S20. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
2. **Couture, F., J. Lachapelle, and R. C. Levesque.** 1992. Phylogeny of LCR-1 and OXA-5 with class A and class D β -lactamases. *Mol. Microbiol.* **6**:1693–1705.
3. **Dortet, L., P. Legrand, C. J. Soussy, and V. Cattoir.** 2006. Bacterial identification, clinical significance, and antimicrobial susceptibilities of *Acinetobacter ursingii* and *Acinetobacter schindleri*, two frequently misidentified opportunistic pathogens. *J. Clin. Microbiol.* **44**:4471–4478.
4. **Figueiredo, S., L. Poirel, J. Croizé, C. Recule, and P. Nordmann.** 2009. In vivo selection of reduced susceptibility to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* related to IS*Aba1*-mediated overexpression of the natural *bla*_{OXA-66} oxacillinase gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:2657–2659.
5. **Figueiredo, S., L. Poirel, A. Papa, V. Koulourida, and P. Nordmann.** 2009. Overexpression of the naturally occurring *bla*_{OXA-51} gene in *Acinetobacter baumannii* mediated by novel insertion sequence IS*Aba9*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:4045–4047.
6. **Giuliani, F., J. D. Docquier, M. L. Riccio, L. Pagani, and G. M. Rossolini.** 2005. OXA-46, a new class D β -lactamase of narrow substrate specificity encoded by a *bla*_{VIM-1}-containing integron from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:1973–1980.
7. **Héritier, C., L. Poirel, P. E. Fournier, J. M. Claverie, D. Raoult, and P. Nordmann.** 2005. Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:4174–4179.
8. **Héritier, C., L. Poirel, T. Lambert, and P. Nordmann.** 2005. Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:3198–3202.
9. **Higgins, P. G., L. Poirel, M. Lehmann, P. Nordmann, and H. Seifert.** 2009. OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:5035–5038.
10. **Liu, S. L., A. Hessel, and K. E. Sanderson.** 1993. Genomic mapping with I-Ceu I, an intron-encoded endonuclease specific for genes for ribosomal RNA, in *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, and other bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**:6874–6878.
11. **Liu, Y. G., N. Mitsukawa, T. Oosumi, and R. F. Whittier.** 1995. Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J.* **8**:457–463.
12. **Liu, Y. G., and R. F. Whittier.** 1995. Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics* **25**:674–681.
13. **Maragakis, L. L., and T. M. Perl.** 2008. *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. *Clin. Infect. Dis.* **46**:1254–1263.
14. **Munoz-Price, L. S., and R. A. Weinstein.** 2008. *Acinetobacter* infection. *N. Engl. J. Med.* **358**:1271–1281.
15. **Peleg, A. Y., H. Seifert, and D. L. Paterson.** 2008. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* **21**:538–582.
16. **Poirel, L., S. Figueiredo, V. Cattoir, A. Carattoli, and P. Nordmann.** 2008. *Acinetobacter radioresistens* as a silent source of carbapenem resistance for *Acinetobacter* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:1252–1256.
17. **Poirel, L., S. Marqué, C. Héritier, C. Segonds, G. Chabanon, and P. Nordmann.** 2005. OXA-58, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:202–208.
18. **Poirel, L., T. Naas, and P. Nordmann.** 2010. Diversity, epidemiology, and genetics of class D β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**:24–38.
19. **Poirel, L., and P. Nordmann.** 2006. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.* **12**:826–836.
20. **Seifert, H., A. Strate, A. Schulze, and G. Pulverer.** 1994. Bacteremia due to *Acinetobacter* species other than *Acinetobacter baumannii*. *Infection* **22**:379–385.
21. **Rathnavelu, S., Y. Zavros, and J. L. Merchant.** 2003. *Acinetobacter lwoffii* infection and gastritis. *Microbes Infect.* **5**:651–657.
22. **Turton, J. F., M. E. Ward, N. Woodford, M. E. Kaufmann, R. Pike, D. M. Livermore, and T. L. Pitt.** 2006. The role of IS*Aba1* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol. Lett.* **258**:72–77.

ARTICLE 3

Identification of the naturally-occurring genes encoding carbapenem-hydrolysing oxacillinases from *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter johnsonii* and *Acinetobacter calcoaceticus*

Journal:	<i>Clinical Microbiology and Infection</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Figueiredo, Samy; Hopital de Bicetre, Service de Bactériologie-Virologie Bonnin, Remy; Hopital de Bicetre, Microbiology Poirel, Laurent; Hopital de Bicetre, Service de Bacteriologie-Virologie Duranteau, Jacques; Hopital de Bicetre, Dept Anesthésie-Reanimation Nordmann, Patrice; Université Paris-Sud, Service de Bactériologie-Virologie
Key Words:	Acinetobacter, oxacillinase, carbapenem resistance, progenitor, carbapenemase
Abstract:	Carbapenem resistance is increasingly reported among <i>Acinetobacter</i> genus and results mostly from the expression of acquired carbapenem-hydrolysing oxacillinases (CHDL). Some <i>Acinetobacter</i> species intrinsically possess chromosomal genes encoding those types of β -lactamases: <i>A. baumannii</i> carries blaOXA-51-, <i>A. radioresistens</i> carries blaOXA-23- and <i>A. lwoffii</i> carries blaOXA-134-like genes. We aimed to identify the progenitors of novel CHDL-encoding genes. We performed a PCR screening using degenerated internal primers designed from a sequence alignment of the known CHDLs (OXA-23, OXA-40, OXA-51, OXA-58, OXA-134, OXA-143) applied to a collection of 50 <i>Acinetobacter</i> sp. strains belonging to twenty-three different species. Two strains of <i>Acinetobacter johnsonii</i> , one strain of <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> and two strains of <i>Acinetobacter haemolyticus</i> were found to respectively harbor blaOXA-211-, blaOXA-213- and blaOXA-214- like genes. In addition, all complete genomes of those three species available on Genbank, i.e. one <i>A. johnsonii</i> genome, four <i>A. calcoaceticus</i> genomes, and one <i>A. haemolyticus</i> genome were analysed and found positive for the

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

	<p>presence of blaOXA-211-, blaOXA-213- and blaOXA-214- like genes, respectively. β-Lactamases OXA-211, OXA-213 and OXA-214 are diverse with amino-acid identities ranging from 53 to 76% compared to the naturally-occurring OXA-51-like CHDL from <i>A. baumannii</i>. Those β-lactamases showed a narrow-spectrum hydrolysis profile, including mostly penicillins and carbapenems. As for blaOXA-23 in <i>A. radioresistens</i> and blaOXA-134 in <i>A. lwoffii</i>, those genes were not expressed (or at a non-significant level expressed) in their host. Detection of these β-lactamase genes might be used as a useful tool for accurate identification of those <i>Acinetobacter</i> species.</p>

SCHOLARONE™
Manuscripts

For Peer Review

20 **ABSTRACT**

21 **Carbapenem resistance is increasingly reported among *Acinetobacter* genus and results**
22 **mostly from the expression of acquired carbapenem-hydrolysing oxacillinases (CHDL).**
23 **Some *Acinetobacter* species intrinsically possess chromosomal genes encoding those**
24 **types of β -lactamases: *A. baumannii* carries bla_{OXA-51} -, *A. radioresistens* carries bla_{OXA-23} -**
25 **and *A. lwoffii* carries $bla_{OXA-134}$ -like genes. We aimed to identify the progenitors of novel**
26 **CHDL-encoding genes. We performed a PCR screening using degenerated internal**
27 **primers designed from a sequence alignment of the known CHDLs (OXA-23, OXA-40,**
28 **OXA-51, OXA-58, OXA-134, OXA-143) applied to a collection of 50 *Acinetobacter* sp.**
29 **strains belonging to twenty-three different species. Two strains of *Acinetobacter***
30 ***johnsonii*, one strain of *Acinetobacter calcoaceticus* and two strains of *Acinetobacter***
31 ***haemolyticus* were found to respectively harbor $bla_{OXA-211}$ -, $bla_{OXA-213}$ - and $bla_{OXA-214}$ - like**
32 **genes. In addition, all complete genomes of those three species available on Genbank, i.e.**
33 **one *A. johnsonii* genome, four *A. calcoaceticus* genomes, and one *A. haemolyticus* genome**
34 **were analysed and found positive for the presence of $bla_{OXA-211}$ -, $bla_{OXA-213}$ - and bla_{OXA-}**
35 **214 - like genes, respectively. β -Lactamases OXA-211, OXA-213 and OXA-214 are diverse**
36 **with amino-acid identities ranging from 53 to 76% compared to the naturally-occurring**
37 **OXA-51-like CHDL from *A. baumannii*. Those β -lactamases showed a narrow-spectrum**
38 **hydrolysis profile, including mostly penicillins and carbapenems. As for bla_{OXA-23} in *A.***
39 ***radioresistens* and $bla_{OXA-134}$ in *A. lwoffii*, those genes were not expressed (or at a non-**
40 **significant level expressed) in their host. Detection of these β -lactamase genes might be**
41 **used as a useful tool for accurate identification of those *Acinetobacter* species.**

INTRODUCTION

Although *Acinetobacter baumannii* is considered as the most clinically-relevant *Acinetobacter* species, there are increasing reports of community- and nosocomial infections caused by non-*baumannii* *Acinetobacter* [1]. This is likely the consequence of the development of genetic tools to identify the different species belonging to *Acinetobacter* genus. *A. haemolyticus* was found to be the causative agent of endocarditis [2] and bloody diarrhea mediated by Shiga Toxin production [3]. *A. johnsonii* was found to be associated with catheter-related bloodstream infections [4]. As there is a close relationship between *A. baumannii* and *A. calcoaceticus*, the term *A. baumannii*-*A. calcoaceticus* complex or Abc complex has been used and, thus, the exact clinical relevance of *A. calcoaceticus* remains unclear [5]. Although the antimicrobial susceptibility in all *Acinetobacter* spp. is usually much higher when compared with *A. baumannii*, antimicrobial resistance in non-*baumannii* *Acinetobacter* species raises concern since multidrug resistant isolates, including carbapenem-resistant isolates, are reported worldwide [6, 7]. Furthermore, some *Acinetobacter* spp. have been shown to intrinsically possess chromosomal genes encoding carbapenem-hydrolysing oxacillinases (CHDLs). Thus, *A. baumannii* carries *bla*_{OXA-51}-, *A. radioresistens* carries *bla*_{OXA-23}- and *A. lwoffii* carries *bla*_{OXA-134}-like genes [8-10]. Characterization of those naturally-occurring CHDLs encoding genes seems important for two reasons. First, those genes may spread into other *Acinetobacter* species like *A. baumannii*, causing outbreaks of carbapenem-resistant strains as it has been reported with *bla*_{OXA-23}-carrying *A. baumannii* isolates [11]. Second, detection of those β -lactamase genes might be used as an additional tool for rapid identification of *Acinetobacter* species. Our working hypothesis was that other *Acinetobacter* species may possess resident carbapenemase genes.

MATERIALS AND METHODS

68 **Bacterial strains**

69 *A. haemolyticus* VAL was recovered from a clinical sample. *A. calcoaceticus* CIP81.8
70 and *A. johnsonii* CIP70.16 was from the Institut Pasteur collection. *A. baumannii* AYE and *A.*
71 *radioresistens* strain 2 were recovered from clinical sample [10]. Our screening panel
72 included *Acinetobacter* sp. strains belonging to 23 different *Acinetobacter* species, including
73 *A. junii*, *A. johnsonii*, *A. haemolyticus*, *A. baylyi*, *A. lwoffii*, *A. radioresistens*, *A. schindleri*, *A.*
74 *ursingii*, *A. calcoaceticus*, *A. gernerii*, *A. tjernbergiae*, *A. bouvetii*, *A. tandoii*, *A. grimontii*, *A.*
75 *towneri*, *A. parvus*, and *Acinetobacter* genomospecies 3, 6, 10, 13, 15, 16 and 17. Those
76 strains were identified at the species level by using 16S rRNA sequencing [12].

78 **Antimicrobial agents and MIC determinations**

79 The antimicrobial agents and their sources have been described previously [13].
80 Antibiotic-containing disks were used for detection of antibiotic susceptibility, with Mueller-
81 Hinton agar plates (Sanofi Diagnostics Pasteur, Marnes-La-Coquette, France) and a disk-
82 diffusion assay (<http://www.sfm.fr>). MICs were determined by agar dilution and E-test (AB
83 Biodisk, Solna, Sweden) [13], with results interpreted according to the guidelines of the
84 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [14].

86 **PCR amplification and cloning experiments**

87 Whole-cell DNA of *A. baumannii* isolate AP was extracted as described previously
88 [10]. PCRs were performed as described previously [10]. Screening for the CHDLs-encoding
89 genes was performed by PCR using degenerate internal primers OXA-CHDL A and OXA-
90 CHDL B (Table 1). Degenerate internal primers were designed in the corresponding
91 nucleotide regions of conserved protein sequences after complete OXA-23, OXA-40, OXA-
92 58, OXA-51, OXA-134 and OXA-143 protein sequences alignment. Complete available

1
2
3 93 genome sequences of *A. haemolyticus* ATCC 19194 (Genbank accession number
4
5 94 NZ_ADMT000000000.1), *A. johnsonii* SH 046 (Genbank accession number ACPL01000000)
6
7
8 95 and *A. calcoaceticus* RUH 2202 (Genbank accession number ZP_06056651.1) were screened
9
10 96 in order to determine genomic sequences flanking the internal fragments of the novel genes
11
12 97 temporarily named *bla*_{OXA-H}, *bla*_{OXA-J} and *bla*_{OXA-C}, respectively. External primers specific for
13
14
15 98 each gene were designed and used for PCR, allowing amplification of the entire sequences of
16
17 99 these genes (Table 1). OXA-calcoaceticus A-B, OXA-haemolyticus A-B and OXA-johnsonii
18
19
20 100 A-B (Table 1) were used to amplify fragments containing the entire oxacillinase encoding
21
22 101 gene using whole-cell DNA from *A. calcoaceticus*, *A. haemolyticus* and *A. johnsonii* as the
23
24
25 102 template.

26
27 103 The obtained PCR fragment was purified with a QIAquick column (Qiagen,
28
29 104 Courtaboeuf, France) and cloned into the pTOPO vector (Qiagen, Courtaboeuf, France).
30
31 105 Recombinant plasmids were selected onto Trypticase soy (TS) agar plates containing
32
33
34 106 amoxicilline (25 mg/ml) and kanamycin (30 mg/ml). The cloned DNA fragment inserted into
35
36 107 one of the recombinant plasmids was sequenced on both strands with an Applied Biosystems
37
38 108 sequencer (ABI 377).

109 110 **Dendrogram and protein analysis**

111
112 The nucleotide and deduced amino acid sequences were analyzed and compared to
113
114 sequences available over the Internet at the National Center for Biotechnology Information
115
116 website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

117
118 Dendrogram was performed with the method of neighbor-joining analysis. The
119
120 alignment used for tree calculation was performed with ClustalX. Branch lengths are
121
122 drawn to scale and are proportional to the number of amino acid changes. The distance
123
124 along the vertical axis has no significance.

118 RESULTS AND DISCUSSION

119 Screening of CHDL genes in a collection of *Acinetobacter* sp.

120 PCR screening using degenerate internal primers gave positive results for *A.*
121 *baumannii*, *A. radioresistens*, *A. lwoffii*, *A. haemolyticus*, *A. johnsonii* and *A. calcoaceticus*.
122 After sequencing, *A. baumannii*, *A. radioresistens* and *A. lwoffii* were found to possess
123 *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-23} and *bla*_{OXA-134} genes respectively, in accordance with previous results [8-
124 10].

126 Susceptibility patterns

127 All the *A. haemolyticus* VAL, *A. johnsonii* CIP 70.16, *A. calcoaceticus* CIP 81.8 and
128 *A. radioresistens* strain 2 isolates were fully susceptible to all antibiotics tested, including
129 penicillins and carbapenems (Table 2). *A. baumannii* strain AYE was only susceptible to
130 carbapenems since it carried ESBL VEB-1 and overexpressed *ampC* gene as previously
131 described [15].

133 Sequencing of CHDL genes

134 Sequencing of the amplicons obtained from *A. haemolyticus*, *A. johnsonii* and *A.*
135 *calcoaceticus* identified three genes encoding novel OXA-type β -lactamases. OXA-H was
136 named OXA-214 and shares 53% amino acid identity with OXA-23, 55% with OXA-51, 53%
137 with OXA-40, 48% with OXA-58. OXA-J was named OXA-211 and shares 55% amino acid
138 identity with OXA-23, 58% with OXA-51, 56% with OXA-40, 52% with OXA-58. OXA-C
139 was named OXA-213 and shares 57% amino acid identity with OXA-23, 76% with OXA-51,
140 62% with OXA-40, 46% with OXA-58.

141 OXA-211, OXA-213 and OXA-214 possessed the typical features of class D β -
142 lactamases, including the STFK tetrad at positions 70 to 73 according to class D β -lactamase

1
2
3 143 (DBL) numbering (Fig. 1) [16]. Also, in OXA-213 and OXA-214, an FGN motif at DBL
4
5 144 positions 144 to 146 replaced the usual YGN motif of classical class D β -lactamases, as
6
7
8 145 observed for other CHDLs except for OXA-58, OXA-51 and OXA-211 [17]. Finally, a KSG
9
10 146 element was identified at DBL positions 216 to 218, as observed in the CHDLs OXA-40 and
11
12 147 OXA-51, whereas a KTG motif is present in most class D β -lactamases, including the CHDLs
13
14
15 148 OXA-23 [17]. A phylogenetic analysis showed that OXA-211, OXA-213 and OXA-214
16
17 149 constituted separate subgroups of CHDLs but that these subgroups were more closely related
18
19
20 150 to the identified class D β -lactamases from *Acinetobacter* spp. than to other known CHDLs
21
22 151 (Fig. 2).
23
24
25
26

27 153 **Distribution of OXA-211, OXA-213 and OXA-214 CHDL encoding genes**

28
29 154 In order to assess whether the novel OXA-encoding genes were naturally present in
30
31 155 those *Acinetobacter* species, the $bla_{\text{OXA-211}}$, $bla_{\text{OXA-213}}$ and $bla_{\text{OXA-214}}$ genes were screened out
32
33 156 in additional clinical isolates of *A. johnsonii*, *A. calcoaceticus* and *A. haemolyticus*,
34
35 157 respectively. PCR using specific primers were performed and were found positive for $bla_{\text{OXA-}}$
36
37 158 $_{214}$ in the two *A. haemolyticus* isolates, for $bla_{\text{OXA-211}}$ in two *A. johnsonii* isolates and for
38
39 159 $bla_{\text{OXA-213}}$ in one *A. calcoaceticus* isolate.
40
41
42

43 160 In addition, the $bla_{\text{OXA-211}}$, $bla_{\text{OXA-213}}$ and $bla_{\text{OXA-214}}$ genes were screened out in all
44
45 161 complete genomes of these three species available on Genbank. The $bla_{\text{OXA-211}}$ gene was
46
47 162 identified in one *A. johnsonii* genome (genbank accession number ACPL01000000), the
48
49 163 $bla_{\text{OXA-213}}$ gene was identified in one *A. haemolyticus* genome (genbank accession number
50
51 164 NZ_ADMT00000000.1) and the $bla_{\text{OXA-214}}$ gene was identified in four *A. calcoaceticus* (*A.*
52
53 165 *calcoaceticus* RUH2202 genbank accession number ZP_06056651.1, *A. calcoaceticus* DR1
54
55 166 genbank accession number CP002080.1, *A. calcoaceticus* PHEA-2 genbank accession number
56
57
58
59
60

1
2
3 167 CP002177.1 and *Acinetobacter* sp. SH024 genbank accession number ZP_06690603.1),
4
5
6 168 respectively.

7
8 169 Thus, screening of clinical isolates and analyze of the available complete genomes for
9
10 170 each species allowed identification of a total of 3 variants of OXA-214 from *A. haemolyticus*,
11
12 171 3 variants of OXA-211 from *A. johnsonii* and 5 variants of OXA-213 from *A. calcoaceticus*.

13
14
15 172

17 173 **Biochemical properties of CHDL OXA-211, OXA-213, OXA-214**

18
19
20 174 To further characterize the activity of OXA-211, OXA-213 and OXA-214, the
21
22 175 enzymes were purified from *E. coli* cultures containing recombinant plasmid expressing those
23
24 176 β -lactamases, as described previously [16]. β -Lactamases OXA-211, OXA-213 and OXA-
25
26 177 214 showed a narrow-spectrum hydrolysis profile. These enzymes were able to hydrolyse
27
28 178 penicillins and carbapenems. However, as observed for most CHDLs, third generation
29
30 179 cephalosporins and monobactams were spared [17]. The rates of carbapenem hydrolysis were
31
32 180 comparable with those of OXA-51 and OXA-23 (Table 3).

33
34
35
36 181

38 182 **Genetic context of CHDL OXA-211, OXA-213, OXA-214**

39
40
41 183 In-silico analysis of whole genome sequences of *A. johnsonii*, *A. haemolyticus* and *A.*
42
43 184 *calcoaceticus* lead to identification of genes surrounding these CHDLs. All were found to be
44
45 185 chromosomally-located. Upstream of the *bla*_{OXA-211} gene from *A. johnsonii*, the *dnaK* gene
46
47 186 was identified, encoding a molecular chaperon that modulates heat shock response in *E. coli*.
48
49 187 Downstream of *bla*_{OXA-211}, an hypothetical open reading frame followed by a matrixin
50
51 188 superfamily protein encoding gene were identified. Upstream of the *bla*_{OXA-213} gene from *A.*
52
53 189 *calcoaceticus*, a gene encoding a putative phage protein was identified, whereas a sortase
54
55 190 family protein encoding gene was identified downstream. Upstream of the *bla*_{OXA-214} gene
56
57 191 from *A. haemolyticus*, a gene encoding an outer membrane protein was identified, and a

1
2
3 192 GGDEF family protein encoding gene was identified downstream. This latter configuration
4
5
6 193 has already been observed for the *bla*_{OXA-23} gene from *A. radioresistens* which was identified
7
8 194 upstream of an AAA ATPase family protein encoding gene [12].
9

10 195
11
12
13 196 In conclusion, this study identified naturally occurring carbapenem-hydrolysing
14
15 197 oxacillinases from *A. haemolyticus*, *A. johnsonii* and *A. calcoaceticus*. None of them
16
17 198 corresponded to acquired CHDLs reported in *A. baumannii* or in any other Gram negative
18
19 199 rods. Since those genes remained highly specific to these species, detection of these β -
20
21 200 lactamase genes might be used as an additional tool for rapid identification of these
22
23
24 201 *Acinetobacter* species.
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 202 **Nucleotide sequence accession number.** The nucleotide sequences of *bla*_{OXA-211},
4
5 203 *bla*_{OXA-212}, *bla*_{OXA-213}, *bla*_{OXA-214} and *bla*_{OXA-215} genes reported in this work are available in the
6
7
8 204 Genbank nucleotide database under the accession number (pending).
9

10 205 **Transparency declaration**

11
12
13 206 This work was partially funded by a grant from the INSERM (U914), the Ministère de
14
15
16 207 l'Education Nationale et de la Recherche (UPRES-EA3539), Université Paris XI, France and
17
18 208 mostly by grants from the European Community (TROCAR, HEALTH-F3-2008-223031 and
19
20 209 TEMPOtest-QC, HEALTH-2009-241742). S. F. was funded by a grant-in-aid from the Fond
21
22
23 210 d'Etudes et de Recherche du Corps Médical des Hôpitaux de Paris. We thank G. Jacoby, who
24
25 211 provided us with the OXA numbering. The authors declare no conflicts of interest.
26

27 212
28 213
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 214 Figures legends.
4
5
6 215
7

8 216 Fig. 1. Amino acid alignment of β -lactamases OXA-211, OXA-213 and OXA-214 identified
9
10 217 in this study respectively from *A. johnsonii*, *A. calcoaceticus* and *A. haemolyticus*.
11
12 218 Amino acid motifs which are well conserved (even if possibly variable) among class
13
14 219 D β -lactamases are shaded in gray. Numbering is according to DBL numbering [16].
15
16
17 220 Asterisks indicate identical amino acid residues between all sequences.
18
19
20 221

21
22 222 Fig. 2. Dendrogram obtained for 22 class D β -lactamases by neighbour-joining analysis. The
23
24 223 alignment used for tree calculation was performed with ClustalX. Branch lengths are
25
26 224 drawn to scale and are proportional to the number of amino acid changes. The distance
27
28 225 along the vertical axis has no significance. The class D β -lactamases which are
29
30 226 considered to be naturally occurring are indicated together with the names of the
31
32
33
34 227 corresponding species.
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

References

1. Espinal P, Roca I, Vila J. Clinical impact and molecular basis of antimicrobial resistance in non-baumannii acinetobacter. *Future Microbiol* 6: 495-511.
2. Castellanos Martinez E, Telenti Asensio M, Rodriguez Blanco VM, Rodriguez Suarez ML, Morena Torrico A, Cortina Llosa A. Infective endocarditis of an interventricular patch caused by *Acinetobacter haemolyticus*. *Infection* 1995; 23: 243-245.
3. Grotiuz G, Sirok A, Gadea P, Varela G, Schelotto F. Shiga toxin 2-producing *Acinetobacter haemolyticus* associated with a case of bloody diarrhea. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3838-3841.
4. Seifert H, Strate A, Schulze A, Pulverer G. Vascular catheter-related bloodstream infection due to *Acinetobacter johnsonii* (formerly *Acinetobacter calcoaceticus* var. lwoffii): Report of 13 cases. *Clin Infect Dis* 1993; 17: 632-636.
5. Doughari HJ, Ndakidemi PA, Human IS, Benade S. The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: an overview. *Microbes Environ* 26: 101-112.
6. Lambert T, Gerbaud G, Galimand M, Courvalin P. Characterization of *Acinetobacter haemolyticus* *aac(6')-ig* gene encoding an aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase which modifies amikacin. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 2093-2100.
7. Quinteira S, Grosso F, Ramos H, Peixe L. Molecular epidemiology of imipenem-resistant *Acinetobacter haemolyticus* and *Acinetobacter baumannii* isolates carrying plasmid-mediated OXA-40 from a portuguese hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 3465-3466.
8. Figueiredo S, Poirel L, Seifert H, Mugnier P, Benhamou D, Nordmann P. OXA-134, a naturally occurring carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase from *Acinetobacter lwoffii*. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 5372-5375.
9. Héritier C, Poirel L, Fournier PE, Claverie JM, Raoult D, Nordmann P. Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 4174-4179.
10. Poirel L, Figueiredo S, Cattoir V, Carattoli A, Nordmann P. *Acinetobacter radioresistens* as a silent source of carbapenem resistance for *Acinetobacter* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 1252-1256.
11. Mugnier PD, Poirel L, Naas T, Nordmann P. Worldwide dissemination of the *bla*_{OXA-23} carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis* 2010; 16: 35-40.

- 1
2
3 261 12. Dortet L, Legrand P, Soussy CJ, Cattoir V. Bacterial identification, clinical
4 significance, and antimicrobial susceptibilities of *Acinetobacter ursingii* and
5 262 *Acinetobacter schindleri*, two frequently misidentified opportunistic pathogens. *J Clin*
6 263 *Microbiol* 2006; 44: 4471-4478.
7 264
8
9 265 13. Bonnin RA, Nordmann P, Potron A, Lecuyer H, Zahar JR, Poirel L. Carbapenem-
10 hydrolyzing GES-type extended-spectrum β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*.
11 266 *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 349-354.
12 267
13
14 268 14. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2011. Performance standards for
15 antimicrobial susceptibility testing; 21st informational supplement. CLSI M100-S21.
16 269 Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA.
17 270
18
19 271 15. Fournier PE, Vallenet D, Barbe V et al. Comparative genomics of multidrug resistance
20 in acinetobacter baumannii. *PLoS Genet.* 2006; 2: e7.
21 272
22
23 273 16. Couture F, Lachapelle J, Levesque RC. Phylogeny of LCR-1 and OXA-5 with class A
24 and class D β -lactamases. *Mol Microbiol* 1992; 6: 1693-1705.
25 274
26
27 275 17. Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D β -
28 lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 24-38.
29 276
30
31 277
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 1. Primers used in this study.

Primers	Sequence (5' to 3')	Purpose
OXA-CHDL A	CCHGCHTCDACHTTYAARAT	Detection of CHDL
OXA-CHDL B	KYHAYABCCMWKSCCADCC	
OXA-calcoaceticus A	ACCGCCATATCAACTTTCC	Detection and amplification of OXA-213, natural CHDL of <i>A. calcoaceticus</i>
OXA-calcoaceticus B	TTGAGCACACCATTTCATCC	
OXA-haemolyticus A	TTTTCTAGCTCGGCTTTCCCC	Detection and amplification of OXA-214, natural CHDL of <i>A. haemolyticus</i>
OXA-haemolyticus B	ATCCCTCTAGGATGATTTCTCCC	
OXA-johnsonii A	TTTAGATCTTAGCCACCC	Detection and amplification of OXA-211, natural CHDL of <i>A. johnsonii</i>
OXA-johnsonii B	AATACGTCTTCTCTATGGGC	

1												
2	Meropenem	0.5	0.38	0.03	0.25	0.19	0.02	0.09	0.032	0.06	0.03	0.02
3												
4	Doripenem	0.5	0.38	0.06	0.12	0.12	0.02	0.06	0.032	0.06	0.03	0.02
5												
6												
7	Imipenem	1	0.25	0.12	0.12	0.12	0.12	1	0.25	0.12	0.25	0.12
8												
9												
10	Ertapenem	8	3	0.06	1	3	0.06	0.12	0.06	0.12	0.06	0.06
11												

12
13 CLA; clavulanic acid (4 µg/ml) TZB; tazobactam (4 µg/ml)
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

Table 3. Specific activities of OXA-51-like from *A. baumannii*, OXA-23 from *A. radioresistens* (used as reference), OXA-211 from *A. johnsonii*, OXA-213 from *A. calcoaceticus*, OXA-214 from *A. haemolyticus* in *E. coli* TOP10.

Substrate (100µM)	Specific activity (mU/mg) ^a				
	OXA-51-like	OXA-213	OXA-214	OXA-211	OXA-23
Benzylpenicillin	98.6	443.0	186.5	169.2	854.1
Cefotaxime	-	-	-	-	-
Ceftazidime	-	-	-	-	-
Aztreonam	-	-	-	-	-
Imipenem	0.41	3.1	2.1	2.7	4.5
Meropenem	0.35	0.1	-	0.1	0.9
Ertapenem	-	2.3	1.5	0.35	0.8

^a Standard deviations were within 10%

^b (-): no detectable hydrolysis

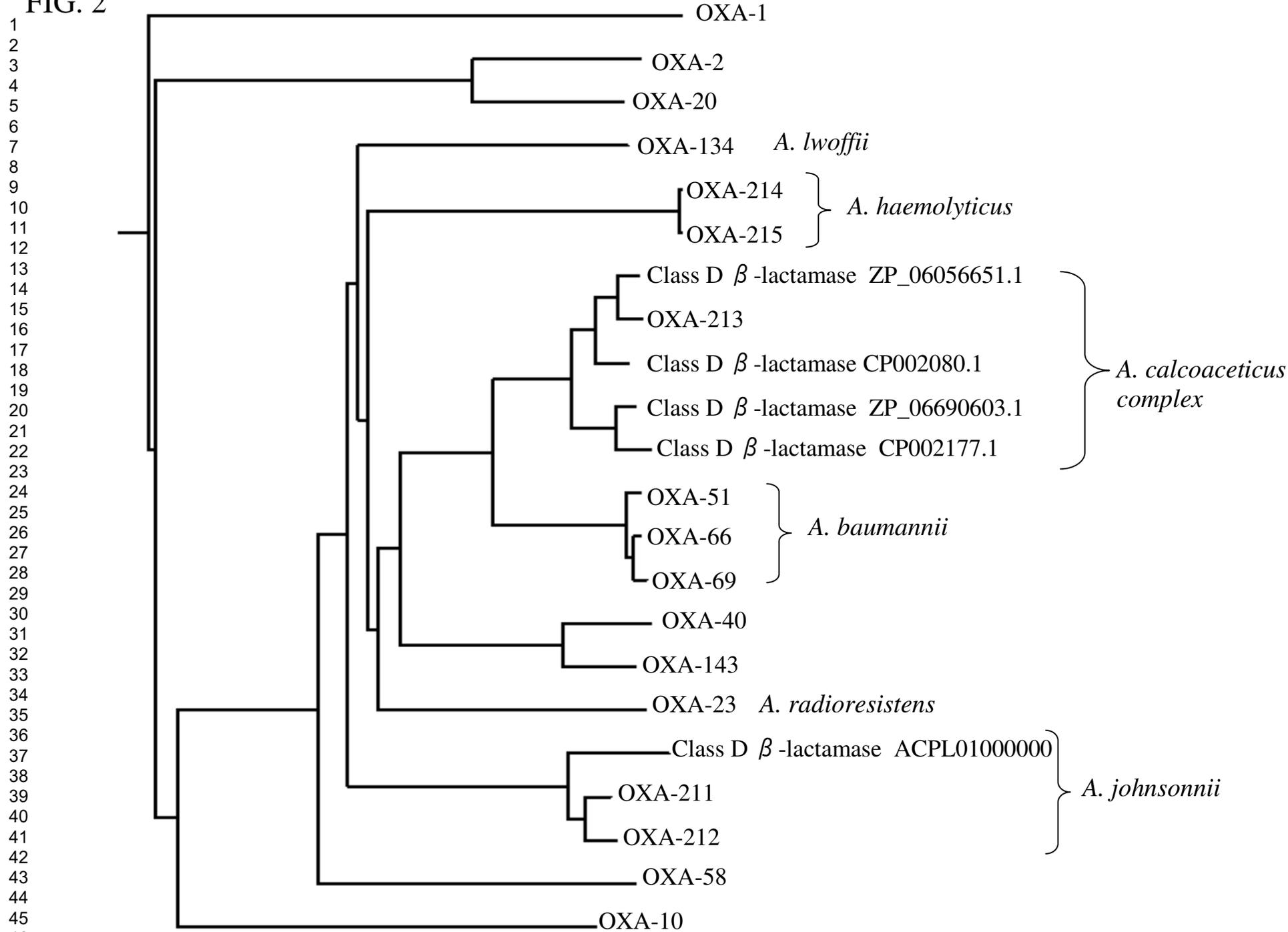
Fig 1.

```

1
2
3
4
5
6 OXA-211 ---MKTQLALIALITTFGSACTTIPPSVETAKNHQQQSAQQQIQQAFDQLQTTGVIVIK
7 OXA-213 ---MYKKALIVATSILFLSACSSNMVKQHQIHSIS-ANKNSEEIKSLFDQAQTTGVLVIK
8 OXA-214 --MKLSKLYTLTVLIGFGLSGVACQHIHTPVSFNQIENDQTKQIASLFENVQTTGVLITF
9 OXA-51 ---MNIKTLTLLITSAIFISACSPYIVTANPNHSASKSDEKAEEKIKNLFNEVHTTGVLVIQ
10 OXA-40 -MKKFILPIFSISILVLSLACSIIKTKSEDNFHS-SQQHEKAIKSYFDEAQTQGVIIK
11 OXA-23 ---MNKYFTCYVVASLFLSGCTVQHNLIN-ETPSQIVQGHNVQIHFQYFDEKNTSGVLVIQ
12 OXA-58 MKLLKILSLVCLSSISIGACAEHMSRAKTSTIPQVNNSIIDQNVQALFNEISADAVFVTY
13
14
15 OXA-211 DKHGLHSYGNLDSRAQTPYVPA|STFKMLNALIGLEHGKATSTEVFKWDGQKRSFPAWEKD
16 OXA-213 RGQTEEIYGNDFKRASDYVPA|STFKMLNALIGLEHHKATTEVFKWNQKRLFPDWEKD
17 OXA-214 DGQAYKAYGNLNRKATYIPAS|STFKILNALIGIEHDKTSPNEVFKWDGQKRAFESWEKD
18 OXA-51 QGQTQQSYGNLDRARSTAYVPA|STFKMLNALIGLEHHKATTEVFKWDGQKRLFPWEKD
19 OXA-40 EGKNLSTYGNALARANKEYVPA|STFKMLNALIGLENHKATTEVFKWDGKRRYPMWEKD
20 OXA-23 TDKKINLYGNALSRANTEYVPA|STFKMLNALIGLENQKTDINEIFKWKGEKRSFTAWEKD
21 OXA-58 DGQNIKKYGTHLDRKATYIPAS|STFKIANALIGLENHKATSTEIFKWDGKPRFFKAWDKD
22
23
24 OXA-211 MTLGQAMQASAVPVYQELARRIGLDLMKKEVQRIGYGNQ|IGTVVDNFWLVGPLQITPVQ
25 OXA-213 MTLGDAMKASAI|PVYQELARRIGLDLMSKEVKRVGFG|GNANIGSKVDNFWLVGPLKITPQQ
26 OXA-214 LTLAEAMQASAVPVYQALAQRI|GLDLMAKEVKRVGFG|NTRIGTVQVDNFWLVGPLKITPIE
27 OXA-51 MTLGDAMKASAI|PVYQDLARRIGLELMSKEVKRVG|YGNADIGTVQVDNFWLVGPLKITPQQ
28 OXA-40 MTLGEAMALSAVPVYQELARRIGLELMQKEVKRVNF|GNTNIGTVQVDNFWLVGPLKITPVQ
29 OXA-23 MTLGEAMKLSAVPVYQELARRIGLDLMQKEVKRIGF|GNAEIGQVQVDNFWLVGPLKVTPIQ
30 OXA-58 FTLGEAMQASTVPVYQELARRIGPSLMQSELRIGYGNM|QIGTEVDQFVLKGPLTITPIQ
31
32
33 OXA-211 EVLFVEKLANTQLAFKPDVQHTVQDMLLIEQKPNYKLYAKSG|WGM DLEPQVGWWTGWVET
34 OXA-213 ETQFAYQLAHKTL|PFSKDVQEQVQSMVFIEEKNGSKIYAKSG|WGM DVEPQVGWLTGWVVQ
35 OXA-214 EAQFAYRLAKQELP|FTPKTQQVIDMLLVDEIRG|TKVYAKSGWGM DITPQVGWWTGWIED
36 OXA-51 EAQFAYKLANKTL|PFSKVDQEVQSMFLIEEKNGN|KIYAKSGWGM DVDPQVGWLTGWVVQ
37 OXA-40 EVNFADDLA|HNRLPFFKLETQEEVKKMLLIEK|VNGSKIYAKSGWGM GVTPQVGWLTGWVEQ
38 OXA-23 EVEFVSQLAHT|QLPFSKQANVKNMMLLLEES|NGYKIFGKTGWAM|DIKPQVGWLTGWVEQ
39 OXA-58 EVKFVYDLA|QGLPFPKPEVQ|QVKEMLYVERR|GENRLYAKSGWGM|AVDPQVGWVYGFVEK
40
41
42 OXA-211 ATSEKVYFALNMHMKTGISASVREQLVKQSLTALGII---
43 OXA-213 PQGEIVAFSLNLEMKKGTPSSIRKEIAYKGLEQLGIL---
44 OXA-214 PNGNIVAFSLNMEMNQPAHAAARKEIVYQALTQLKLL---
45 OXA-51 PQGNIVAFSLNLEMKKGIPSSVRKEITYKSLEQLGIL---
46 OXA-40 ANGKKIPFSLNLEMKEGMSGIRNEITYKSLENLGI---
47 OXA-23 PDGKIVAFALNMEMRSEMPASIRNELLMKSLKQLNII---
48 OXA-58 ADGQVAFALNMQMKAGDDIALRKQLSLDVLDKLGVFHYL
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

```

FIG. 2



Submission Document: *Clinical Microbiology and Infection***Manuscript title:**

Identification of the naturally-occurring genes encoding carbapenem-hydrolysing oxacillinases from *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter johnsonii* and *Acinetobacter calcoaceticus*

Full names of all authors:

S. Figueiredo, R.A. Bonnin, L. Poirel, J. Duranteau, P. Nordmann

1. Tick the box to affirm that:

the manuscript or a significant part of it has not been published and is not submitted elsewhere;

all named authors have read and agreed to the submitted version of the manuscript;

all individuals named as an author have made a significant contribution to the overall design of the study or the execution of the work described and assume responsibility for the content of the entire paper;

all results presented previously at a scientific meeting or in another public context have been acknowledged.

2. Please declare any conflicts of interest relating to this manuscript for each author, including:

- all sources of funding or sponsorship, or any financial benefit, during the past three years;

This work was partially funded by a grant from the INSERM (U914), the Ministère de l'Education Nationale et de la Recherche (UPRES-EA3539), Université Paris XI, France and mostly by grants from the European Community (TROCAR, HEALTH-F3-2008-223031 and TEMPOtest-QC, HEALTH-2009-241742). S. F. was funded by a grant-in-aid from the Fond d'Etudes et de Recherche du Corps Médical des Hôpitaux de Paris.

- presence or absence of any relationship or any degree of conflicting or dual interest, financial or of any other nature, that may affect professional judgment in relation to the submitted article.

ARTICLE 4

In Vivo Selection of Reduced Susceptibility to Carbapenems in *Acinetobacter baumannii* Related to IS*Aba1*-Mediated Overexpression of the Natural *bla*_{OXA-66} Oxacillinase Gene[∇]

Samy Figueiredo,¹ Laurent Poirel,¹ Jacques Croize,² Christine Recule,² and Patrice Nordmann^{1*}

Service de Bactériologie-Virologie, INSERM U914 Emerging Resistance to Antibiotics, Hôpital de Bicêtre, Assistance Publique/Hôpitaux de Paris, Faculté de Médecine et Université Paris-Sud, K.-Bicêtre, France,¹ and Département de Bactériologie-Microbiologie, DAI Pôle de Biologie, Grenoble, France²

Received 18 December 2008/Returned for modification 1 March 2009/Accepted 15 March 2009

Two clonally related *Acinetobacter baumannii* isolates, A1 and A2, were obtained from the same patient. Isolate A2, selected after an imipenem-containing treatment, showed reduced susceptibility to carbapenems. This resistance pattern was related to insertion of the IS*Aba1* element upstream of the naturally occurring *bla*_{OXA-66} carbapenemase gene as demonstrated by sequencing, reverse transcription-PCR analysis, and inactivation of the *bla*_{OXA-66} gene.

Acinetobacter baumannii is a gram-negative nonfermenting coccobacillus with a noticeable increase in resistance to carbapenems due to various and combined mechanisms, but mostly related to carbapenemases (11, 14). These carbapenemases are mostly carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamases (CHDLs) which have been identified worldwide in *Acinetobacter* spp. The four groups of CHDLs identified in *A. baumannii* are the naturally occurring OXA-51-like β -lactamase and the acquired OXA-23-like, OXA-24/OXA-40-like, and OXA-58-like β -lactamases (14). Whereas the contribution of acquired CHDLs in carbapenem resistance is known (5), despite their weak ability to hydrolyze carbapenems (4), the naturally occurring OXA-51-like enzymes may be involved in resistance or decreased susceptibility to carbapenems (4, 8, 15, 16). The presence of the IS*Aba1* element upstream of *bla*_{OXA-51}-like genes might provide promoter sequences enhancing expression of these genes, as observed with the naturally occurring *bla*_{ampC} gene (named *bla*_{ADC}) of *A. baumannii*.

We report here the clinical, microbiological, and genetic features associated with the isolation of isogenic *A. baumannii* strains, with or without reduced susceptibility to carbapenems, recovered after an imipenem-containing treatment.

Patients and strains. Carbapenem-susceptible *A. baumannii* isolate A1 was recovered from rectal and wound swabs from a 62-year-old patient hospitalized for severe trauma in June 2007 in the intensive care unit of Grenoble Hospital, France. After 3 weeks of an imipenem-containing treatment (500 mg three times daily together with ciprofloxacin and linezolid), a carbapenem-nonsusceptible *A. baumannii* isolate, A2, was recovered from the same patient from an endotracheal aspirate

(Table 1). Both isolates were identified with the API 32GN system (bioMérieux SA, Marcy-l'Étoile, France), and identification was confirmed by sequencing of 16S rRNA genes as described previously (3). During the following months, an outbreak of *A. baumannii* A1 was identified at Grenoble Hospital involving 36 patients (eight infections and 28 colonizations) (data not shown).

Susceptibility testing. Antibiotic susceptibilities of *A. baumannii* isolates A1 and A2 were determined and interpreted as described previously (1, 13). Production of extended-spectrum β -lactamase and overexpression of the AmpC cephalosporinase were evaluated as described previously (13). Metallo- β -lactamase production was evaluated by using Etest strips with imipenem and EDTA (AB Biodisk, Solna, Sweden). MICs of β -lactams were determined by using Etest strips on Mueller-Hinton agar plates at 37°C. *A. baumannii* isolate A1 was susceptible to imipenem, meropenem, and colistin. *A. baumannii* isolate A2 had a resistance profile similar to that of isolate A1 but with reduced susceptibility to imipenem and meropenem (Table 1). Antimicrobial susceptibility testing performed with cloxacillin-containing plates suggested overexpression of the naturally occurring gene *bla*_{ADC} in both isolates. Neither extended-spectrum β -lactamase nor metallo- β -lactamase production was detected in either isolate.

Molecular investigations. Pulsed-field gel electrophoresis was performed as described previously (13) using restriction enzyme ApaI (GE Healthcare, Orsay, France) for genotyping *A. baumannii* isolates and showed indistinguishable patterns between isolates A1 and A2 (data not shown). Preliminary PCR experiments followed by sequencing with published primers (9) revealed that both isolates possessed a *bla*_{TEM-1} gene. PCR analysis and sequencing performed as described previously (2, 6) identified IS*Aba1* 9 bp upstream of the *bla*_{ADC} gene in isolates A1 and A2, further confirming overexpression of AmpC.

* Corresponding author. Mailing address: Service de Bactériologie-Virologie, Hôpital de Bicêtre, 78 Rue du Général Leclerc, 94275 Le Kremlin-Bicêtre Cedex, France. Phone: 33-1-45-21-36-32. Fax: 33-1-45-21-63-40. E-mail: nordmann.patrice@bct.aphp.fr.

[∇] Published ahead of print on 23 March 2009.

TABLE 1. MICs of β -lactams for the *A. baumannii* strains

β -Lactam	MIC of indicated isolate ($\mu\text{g/ml}$)		
	A1	A2	A2 ($\Delta\text{OXA-66}$)
Imipenem	2	4	0.5
Meropenem	3	6	0.5
Rifampin	8	8	128
Ceftazidime	128	128	128

Genes coding for the acquired CHDLs were searched out by using PCR analysis as described previously (5, 12), but results remained negative for both isolates. However, the same *bla*_{OXA-66} gene corresponding to the intrinsic *bla*_{OXA-51}-like gene of *A. baumannii* was identified in isolates A1 and A2 by using primers PreOXA-Ab-1 and PreOXA-Ab-2 (Table 2). *ISAbal* was identified 7 bp upstream of the *bla*_{OXA-66} gene in isolate A2 but not in isolate A1. This insertion element belonging to the IS4 family (10) was inserted in such a way that its transposase gene was in the opposite orientation with respect to *bla*_{OXA-66}. That discrepancy between isolates A1 and A2 might explain the different resistance profiles toward carbapenems. Noteworthy is that a PCR experiment confirmed that isolate A1 originally possessed *ISAbal* in its genome.

In order to investigate the possible indirect involvement of that *ISAbal*-*bla*_{OXA-66} structure in reduced susceptibility to carbapenems, quantitative reverse transcription-PCR (RT-PCR) experiments were performed to measure the *bla*_{OXA-66} expression. Bacterial strains were grown aerobically in Luria-Bertani broth until mid-log phase; aliquots were removed and added to RNeasy Protect (Qiagen, Courtaboeuf, France), and total cellular RNA was extracted using the RNeasy mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. One-step RT-PCR was performed using a LightCycler (Roche, Mannheim, Germany) with the QuantiFast SYBR green RT-PCR kit (Qiagen). A post-PCR melting curve analysis was performed as described elsewhere (7). The *bla*_{OXA-66} transcript levels were normalized against the 16S rRNA gene, and quantifications were repeated in triplicate (primers used are listed in Table 2 and referenced elsewhere [5]). Transcriptional profile analysis indicated a 50-fold increased expression of *bla*_{OXA-66} in isolate

A2 compared with that of isolate A1 (mean \pm the standard deviation, 50 ± 6.7).

In order to better precisely identify the role of OXA-66 expression in reduced susceptibility to carbapenems in isolate A2, a knockout mutant for the *bla*_{OXA-66} gene was constructed as described previously (5). Briefly, plasmid pACYC184 unable to replicate in *A. baumannii* and harboring a chloramphenicol resistance gene was used as a suicide vector. The *arr-2* gene conferring resistance to rifampin obtained as described previously (5) was inserted into the EcoRV-restricted plasmid pACYC184, giving rise to pACYC184-RA. An internal fragment of the *bla*_{OXA-66} gene was generated using primers OXA-Abint-BamHI-A and OXA-Abint-BamHI-B (Table 2) and inserted into the BamHI-restricted plasmid pACYC184-RA, giving rise to plasmid pACYC184-RA-OXA-66, and then introduced into the rifampin-susceptible *A. baumannii* A2 isolate by electrotransformation. Selection of *A. baumannii* A2 (pACYC184-RA-OXA-66) was made on plates containing rifampin (25 $\mu\text{g/ml}$) and chloramphenicol (40 $\mu\text{g/ml}$). Inactivation of the *bla*_{OXA-66} gene by insertion of pACYC184-RA-OXA-66 was verified by PCR amplification of the *arr-2* gene and nonamplification of the entire *bla*_{OXA-66} gene under standard PCR conditions. Inactivation of the *bla*_{OXA-66} gene resulted in increased susceptibility to carbapenems in *A. baumannii* A2 ($\Delta\text{OXA-66}$) compared to that in *A. baumannii* isolates A2 and A1 (Table 1), indicating that the *bla*_{OXA-66} gene was involved in reduced susceptibility to carbapenems even when weakly expressed, such as in isolate A1.

Conclusions. This study corresponds to the first report of an in vivo selection of reduced susceptibility to carbapenems in *A. baumannii*. This reduced susceptibility to carbapenems was related to selection of the *ISAbal*-related overexpression of *bla*_{OXA-66}. Turton et al. (16) had suggested the involvement of *ISAbal* in the overexpression of *bla*_{OXA-51}-like genes, and other studies showed their significant expression levels by using RT-PCR experiments (8, 15). However, inactivation of the *bla*_{OXA-51}-like gene had not been performed to clearly assess the real impact of this mechanism. We demonstrated here that inactivation of a *bla*_{OXA-66} gene in *A. baumannii* results in a higher susceptibility to carbapenems. Although the *ISAbal*-*bla*_{OXA-66} association may lead to reduced susceptibility to carbapenems, it may constitute a resistance mechanism that could enhance selection of other mechanisms of resistance,

TABLE 2. Primers used in this study

Primer	Sequence (5' to 3')	Target
AmpC-2 ^a	ACAGCCATACCTGGCACATC	<i>bla</i> _{ampC}
P13B ^b	CGGGATCCCAGGCCCGGAAC	16S rRNA
UNI14	GTGCCAGCAGCCGCGTAAT	16S rRNA
PB ^b	TAACACATGCAAGTCAACG	16S rRNA
BAK2	GGACTACHAGGGTATCTAT	16S rRNA
16S1	GGAGGAAGGTGGGGATGACG	RT-PCR of 16S rRNA gene
16S3	TCTGATCCGCGATTACTAGCG	RT-PCR of 16S rRNA gene
PreOXA-Ab-1	CTAATAATTGATCTACTCAAG	<i>bla</i> _{OXA-51-like}
PreOXA-Ab-2	CCAGTGGATGGATAGATTATC	<i>bla</i> _{OXA-51-like}
OXA-Abint-BamHI-A	CGGGATCCCAGCCGACCGAGTATGTACCTGCTT	<i>bla</i> _{OXA-66} , internal primer
OXA-Abint-BamHI-B	CGGGATCCCAGCTAAGTTAAGGGAGAACGC	<i>bla</i> _{OXA-66} , internal primer

^a The AmpC-2 primer is used with *ISAbal*-B.

^b The P13B primer is used together with UNI14; the PB primer is used together with BAK2.

efflux overexpression, impaired permeability, or acquisition of other CHDLs.

This work was supported by a grant from the Ministère de l'Éducation Nationale et de la Recherche from France (grant UPRES-EA3539, Université Paris XI, Paris, France) and mostly by a grant from the European Community (6th PCRD, LSHM-CT-2005-018705) and by the INSERM.

S.F. was funded by a grant-in-aid from the Fonds d'Etude et de Recherche du Corps Médical des Hôpitaux de Paris, Paris, France.

REFERENCES

1. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2008. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 18th informational supplement. CLSI M100-S18. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
2. **Corvec, S., N. Caroff, E. Espaze, C. Giraudeau, H. Drugeon, and A. Reynaud.** 2003. AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**:629–635.
3. **Dortet, L., P. Legrand, C.-J. Soussy, and V. Cattoir.** 2006. Bacterial identification, clinical significance, and antimicrobial susceptibilities of *Acinetobacter ursingii* and *Acinetobacter schindleri*, two frequently misidentified opportunistic pathogens. *J. Clin. Microbiol.* **44**:4471–4478.
4. **Héritier, C., L. Poirel, P. E. Fournier, J. M. Claverie, D. Raoult, and P. Nordmann.** 2005. Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:4174–4179.
5. **Héritier, C., L. Poirel, T. Lambert, and P. Nordmann.** 2005. Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:3198–3202.
6. **Héritier, C., L. Poirel, and P. Nordmann.** 2006. Cephalosporinase overexpression resulting from insertion of *ISAbal1* in *Acinetobacter baumannii*. *Clin. Microbiol. Infect.* **12**:123–130.
7. **Higgins, P. G., H. Wisplinghoff, D. Stefanik, and H. Seifert.** 2004. Selection of topoisomerase mutations and overexpression of *adeB* mRNA transcripts during an outbreak of *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* **54**:821–823.
8. **Hu, W. S., S. M. Yao, C. P. Fung, Y. P. Hsieh, C. P. Liu, and J. Lin.** 2007. An OXA-66/OXA-51-like carbapenemase and possibly an efflux pump are associated with resistance to imipenem in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:3844–3852.
9. **Mammeri, H., M. Van de Loo, L. Poirel, L. Martinez-Martinez, and P. Nordmann.** 2005. Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:71–76.
10. **Mugnier, P. D., L. Poirel, and P. Nordmann.** 2009. Functional analysis of insertion sequence *ISAbal1*, responsible for genomic plasticity of *Acinetobacter baumannii*. *J. Bacteriol.* **191**:2414–2418.
11. **Peleg, A. Y., H. Seifert, and D. L. Paterson.** 2008. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* **21**:538–582.
12. **Poirel, L., S. Marqué, C. Héritier, C. Segonds, G. Chabanon, and P. Nordmann.** 2005. OXA-58, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:202–208.
13. **Poirel, L., O. Menuteau, N. Agoli, C. Cattoen, and P. Nordmann.** 2003. Outbreak of extended-spectrum β -lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. *J. Clin. Microbiol.* **41**:3542–3547.
14. **Poirel, L., and P. Nordmann.** 2006. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.* **12**:826–836.
15. **Ruiz, M., S. Marti, F. Fernandez-Cuenca, A. Pascual, and J. Vila.** 2007. High prevalence of carbapenem-hydrolyzing oxacillinases in epidemiologically related and unrelated *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Spain. *Clin. Microbiol. Infect.* **13**:1192–1198.
16. **Turton, J. F., M. E. Ward, N. Woodford, M. E. Kaufmann, R. Pike, D. M. Livermore, and T. L. Pitt.** 2006. The role of *ISAbal1* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol. Lett.* **258**:72–77.

ARTICLE 5

Overexpression of the Naturally Occurring *bla*_{OXA-51} Gene in *Acinetobacter baumannii* Mediated by Novel Insertion Sequence IS*Aba9*^V

Resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* is increasingly reported and is mostly associated with expression of carbapenemases (3, 6). Those carbapenemases are most frequently carbapenem-hydrolyzing class D β-lactamases, which have been identified worldwide, including in Greece (4, 10). Four major subgroups of carbapenem-hydrolyzing class D β-lactamases have been identified in *A. baumannii*: the naturally occurring OXA-51/69-type β-lactamase and the acquired OXA-23, OXA-24/40 and OXA-58-type β-lactamases. Despite a weak catalytic activity, the naturally occurring OXA-51/69-type β-lactamases might contribute to carbapenem resistance by insertion of IS*Aba1* in the promoter region of the *bla*_{OXA-51/69}-like genes (1, 8, 11).

Twenty nonrepetitive carbapenem-resistant *A. baumannii* clinical isolates were isolated from August 2001 to November 2006 at the Papageorgiou General Hospital, Thessaloniki, Greece (Table 1). All 20 isolates were resistant to imipenem, among which 8 were additionally resistant to meropenem (MICs ranging from 8 to 64 μg/ml) (Table 1). No metallo-β-lactamase (MBL) production was detected by using Etest MBL strips (AB Biodisk, Solna, Sweden). Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis was done as previously described (Bio-Rad, Ivry-sur-Seine, France) (5, 9) and showed that the 20 *A. baumannii* isolates exhibited 5 distinct PFGE profiles defining clones I to V (Table 1). PCR experiments performed using primers specific for *bla*_{OXA-58}-like, *bla*_{OXA-23}-like, and *bla*_{OXA-24/40}-like genes (12) showed that 16 isolates belonging to clones I, II, or III possessed the *bla*_{OXA-58} gene, whereas no isolate harbored the *bla*_{OXA-23} or *bla*_{OXA-40} genes. PCR experiments using primers specific for the naturally occurring *bla*_{OXA-51}-like gene gave positive results for the 20 *A. baumannii* strains tested. In three clonally related and *bla*_{OXA-58}-negative *A. baumannii* isolates, Ab2, Ab5, and Ab23, IS*Aba1* was identified upstream of the *bla*_{OXA-51} gene (11) (Table 1). In

isolate Ab5, the IS*Aba1* copy located immediately upstream of the *bla*_{OXA-51} gene was truncated by a novel insertion sequence named “IS*Aba9*” (Fig. 1). IS*Aba9* is 974 bp long and belongs to the IS982 family (<http://www-is.biotoul.fr/>). It possesses 17-bp inverted repeats and was bracketed by an 8-bp target site duplication (TTGTTTAA), which is likely the signature of a transposition process. IS*Aba9* was very recently identified in association with the *bla*_{RTG-4} gene in *A. baumannii* (7). We hypothesized that IS*Aba9* located upstream of the *bla*_{OXA-51} gene in isolate Ab5 might contribute to carbapenem resistance by providing promoter sequences leading to the overexpression of the *bla*_{OXA-51} gene, as observed with IS*Aba1* (2, 8, 11). Analysis of the genetic environment of the *bla*_{OXA-51} gene in Ab5 showed that IS*Aba1* provided –35 and –10 promoter sequences, as already described (1). In addition, a hybrid promoter made of a –35 box located inside IS*Aba9* and a –10 box located in IS*Aba1* with an optimal 17-bp spacing between the –35 and –10 boxes was identified (Fig. 1). Quantitative analysis of the *bla*_{OXA-51} expression was performed by reverse transcription-PCR using the two clonally related isolates Ab2 and Ab5, as previously described (1). Transcriptional profile analysis indicated an eightfold increased expression of *bla*_{OXA-51} in the genetic structure containing IS*Aba1* and IS*Aba9* compared with IS*Aba1* alone upstream of this gene (mean ± standard deviation, 8 ± 5), using the 16S RNA gene as a housekeeping gene. PCR screening of the 20 *A. baumannii* isolates using primers specific for IS*Aba9* gave positive results for isolates Ab2, Ab3, Ab5, and Ab23, but IS*Aba9* was located upstream of the *bla*_{OXA-51}-like gene only in isolate Ab5.

In conclusion, we identified the novel insertion sequence IS*Aba9* as being involved in *bla*_{OXA-51} gene overexpression, thus contributing to carbapenem resistance in *A. baumannii*. IS*Aba9*, after IS*Aba1*, might be an additional tool for genetic

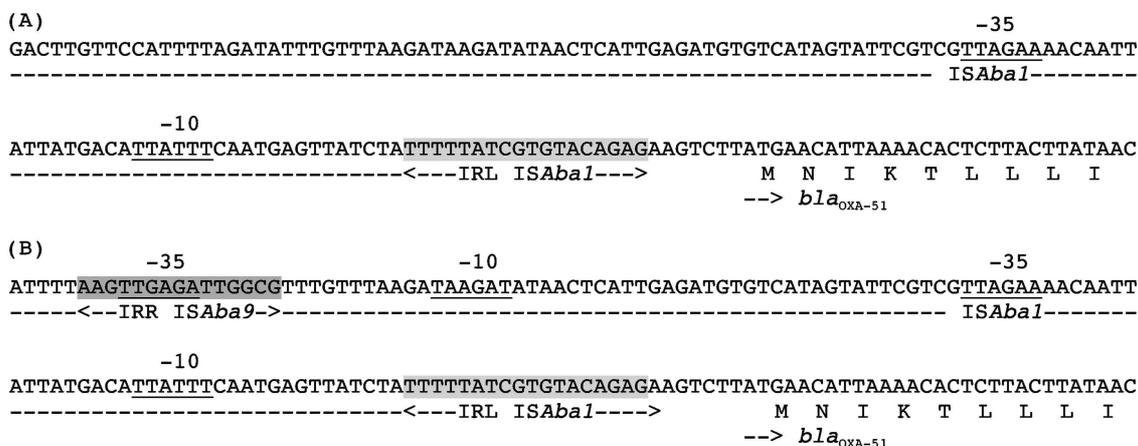


FIG. 1. Nucleotide sequence of the –35 and –10 putative promoter regions within IS*Aba1* described from isolates Ab2 (A) and Ab5 (B). The left inverted repeat (IRL) of IS*Aba1* and the right inverted repeat (IRR) of IS*Aba9* are shaded in gray, and the –35 and –10 putative sequences are underlined.

TABLE 1. Characteristics of *A. baumannii* isolates

No.	PFGE type	Date of isolation (mo/day/yr)	Ward	MIC ($\mu\text{g/ml}$) ^a		Source of isolate	<i>bla</i> _{OXA-51} -like type	Presence/absence of:				
				IMP	MEM			<i>bla</i> _{OXA-58}	<i>ISAbal</i>	<i>ISAbal</i> upstream of <i>bla</i> _{OXA-51} -like	<i>ISAbal9</i>	<i>ISAbal9</i> upstream of <i>bla</i> _{OXA-51} -like
Ab2	V	08/20/02	ICU ^b	4	2	Skin swab	<i>bla</i> _{OXA-51}	–	+	+	+	–
Ab5	V	09/20/01	ICU	64	64	Drainage liquid	<i>bla</i> _{OXA-51}	–	+	+	+	+
Ab23	V	06/22/04	Heart surgery	64	32	Urine	<i>bla</i> _{OXA-51}	–	+	+	+	–
Ab3	IV	12/13/02	ICU	8	16	Pharyngeal swab	<i>bla</i> _{OXA-66}	–	–	–	+	–
Ab11	III	09/16/03	ICU	64	16	Wound	<i>bla</i> _{OXA-64}	+	+	–	–	–
Ab133	III	12/10/05	Heart surgery	8	4	Skin swab	<i>bla</i> _{OXA-64}	+	+	–	–	–
Ab150	III	03/19/06	Plastic surgery	16	4	Blood culture	<i>bla</i> _{OXA-64}	+	+	–	–	–
Ab168	III	10/21/06	ICU	12	4	Blood culture	<i>bla</i> _{OXA-64}	+	+	–	–	–
Ab12	II	09/29/03	ICU	64	16	Wound	<i>bla</i> _{OXA-66}	+	–	–	–	–
Ab30	II	02/24/04	ICU	64	16	Bronchial aspirate	<i>bla</i> _{OXA-66}	+	–	–	–	–
Ab58	II	01/11/05	Neurology	16	8	Urine	<i>bla</i> _{OXA-66}	+	–	–	–	–
Ab177	II	11/07/06	External unit	8	4	Wound	<i>bla</i> _{OXA-66}	+	–	–	–	–
Ab33	II	10/21/04	Heart surgery	64	16	Wound	<i>bla</i> _{OXA-66}	+	–	–	–	–
Ab63	II	11/02/04	1st surgery	16	8	Blood culture	<i>bla</i> _{OXA-66}	+	–	–	–	–
Ab91	II	05/28/05	ICU	16	4	Wound	<i>bla</i> _{OXA-66}	+	–	–	–	–
Ab153	II	04/20/06	ICU	16	4	Venal catheter	<i>bla</i> _{OXA-66}	+	–	–	–	–
Ab185	II	11/23/06	Neurosurgery	24	8	Venal catheter	<i>bla</i> _{OXA-66}	+	–	–	–	–
Ab108	I	09/04/05	Heart surgery	16	4	Blood culture	<i>bla</i> _{OXA-92}	+	–	–	–	–
Ab114	I	09/23/05	Short stay	16	6	Urine	<i>bla</i> _{OXA-92}	+	–	–	–	–
Ab181	I	11/15/06	Heart surgery	32	6	Blood culture	<i>bla</i> _{OXA-92}	+	–	–	–	–

^a IMP, imipenem; MEM, meropenem.^b ICU, intensive care unit.

plasticity of *A. baumannii* and, in particular, for acquisition of resistance.

This work was funded by a grant from the Ministère de l'Éducation Nationale et de la Recherche (UPRES-EA3539), Université Paris XI, Paris, France, and mostly by grants from the European community (LSHM-CT-2005-018705 and TROCAR HEALTH-F3-2008-223031) and INSERM. S. F. was funded by a grant-in-aid from the Fond d'Études et de Recherche du Corps Médical des Hôpitaux de Paris.

REFERENCES

1. **Figueiredo, S., L. Poirel, J. Croize, C. Recule, and P. Nordmann.** 2009. In vivo selection of reduced susceptibility to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* related to IS*Aba1*-mediated overexpression of the natural bla_{OXA-66} oxacillinase gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:2657–2659.
2. **Héritier, C., L. Poirel, P.-E. Fournier, J.-M. Claverie, D. Raoult, and P. Nordmann.** 2005. Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:4174–4179.
3. **Munoz-Price, L. S., and R. A. Weinstein.** 2008. *Acinetobacter* infection. *N. Engl. J. Med.* **358**:1271–1281.
4. **Poirel, L., E. Lebessi, C. Héritier, A. Patsoura, M. Foustoukou, and P. Nordmann.** 2006. Nosocomial spread of OXA-58-positive carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in a paediatric hospital in Greece. *Clin. Microbiol. Infect.* **12**:1138–1141.
5. **Poirel, L., O. Menuteau, N. Agoli, C. Cattoen, and P. Nordmann.** 2003. Outbreak of extended-spectrum β -lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. *J. Clin. Microbiol.* **41**:3542–3547.
6. **Poirel, L., and P. Nordmann.** 2006. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.* **12**:826–836.
7. **Potron, A., L. Poirel, J. Croizé, V. Chantepedrix, and P. Nordmann.** 2009. Genetic and biochemical characterization of the first extended-spectrum CARB-type β -lactamase (RTG-4) from *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:3010–3016.
8. **Ruiz, M., S. Marti, F. Fernandez-Cuenca, A. Pascual, and J. Vila.** 2007. High prevalence of carbapenem-hydrolysing oxacillinases in epidemiologically related and unrelated *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Spain. *Clin. Microbiol. Infect.* **13**:1192–1198.
9. **Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, and B. Swaminathan.** 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* **33**:2233–2239.
10. **Tsakris, A., A. Ikonomidis, A. Poulou, N. Spanakis, D. Vrizas, M. Diomidous, S. Pournaras, and F. Markou.** 2008. Clusters of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clones producing different carbapenemases in an intensive care unit. *Clin. Microbiol. Infect.* **14**:588–594.
11. **Turton, J. F., M. E. Ward, N. Woodford, M. E. Kaufmann, R. Pike, D. M. Livermore, and T. L. Pitt.** 2006. The role of IS*Aba1* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol. Lett.* **258**:72–77.
12. **Woodford, N., M. J. Ellington, J. M. Coelho, J. F. Turton, M. E. Ward, S. Brown, S. G. Amyes, and D. M. Livermore.** 2006. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int. J. Antimicrob. Agents* **27**:351–353.

Samy Figueiredo

Laurent Poirel

INSERM U914

"Emerging Resistance to Antibiotics"

Hôpital de Bicêtre

Faculté de Médecine et Université Paris-Sud K.-Bicêtre 94275, France

Anna Papa

Department of Microbiology

Medical School

Aristotle University

Thessaloniki, Greece

Vassiliki Koulourida

Microbiological Department

Papageorgiou General Hospital

Thessaloniki, Greece

Patrice Nordmann*

Service de Bactériologie-Virologie

INSERM U914

"Emerging Resistance to Antibiotics"

Hôpital de Bicêtre

Faculté de Médecine et Université Paris-Sud K.-Bicêtre 94275, France

*Phone: 33-1-45-21-36-32

E-mail: nordmann.patrice@bct.aphp.fr

^v Published ahead of print on 29 June 2009.

ARTICLE 6

First identification of VIM-4 metallo- β -lactamase in *Acinetobacter* spp.

10.1111/j.1469-0691.2007.01942.x

We read with interest the study in *CMI* by Wroblewska *et al.* [1], which reported the identification of a VIM-type metallo- β -lactamase (MBL) determinant in *Acinetobacter baumannii* in Poland. Resistance to carbapenems in *Acinetobacter* spp. is increasingly reported worldwide and is associated with various resistance mechanisms, but mostly with the expression of carbapenemases [2]. Carbapenem-hydrolysing class D β -lactamases are widespread and have been identified worldwide in *Acinetobacter* spp., whereas MBLs are much less prevalent in this genus [3]. VIM-2-producing *Acinetobacter* spp. have been isolated in the Far East [4] and in Germany [5], while the VIM-1 determinant has been reported only once in *A. baumannii* in Greece [6]. VIM-4 is a point mutant of VIM-1 and has previously been identified only in Enterobacteriaceae [7] and *Pseudomonas* spp. [8]. We now wish to report the identification of the VIM-4 MBL determinant in *Acinetobacter* genomospecies 16.

Twenty-two carbapenem-resistant clinical isolates of *Acinetobacter* spp. were collected between 2001 and 2006 at the Papageorgiou General Hospital, Thessaloniki, Greece. Since there is an increasing incidence of MBL determinants among enterobacterial [9] and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Greece [10], we aimed to evaluate their possible spread among *Acinetobacter* spp. The isolates were characterised using phenotypic (ATB 32 GN and Vitek 2 systems; bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) and genotypic (16S rRNA gene sequencing [11]) approaches. Imipenem susceptibility was determined using the disk-diffusion technique (<http://www.sfm.fr>) and antibiotic disks from Sanofi-Diagnostics Pasteur (Marnes-La-Coquette, France). The production of MBL was evaluated using the imipenem-EDTA Etest synergy test as recommended by the manufacturer (AB Biodisk, Solna, Sweden). A single isolate, *Acinetobacter* sp. 154, yielded a positive MBL test. This isolate was resistant to ceftazidime (MIC 256 mg/L), imipenem (MIC 32 mg/L) and meropenem (MIC 32 mg/L), but was susceptible to amoxicillin-clavulanate and ticarcillin-clavulanate combinations, and also to aztreonam. In addition, isolate 154 was resistant to chloramphenicol, sulphonamides, amikacin and kanamycin,

but was susceptible to gentamicin, nalidixic acid, fluoroquinolones, rifampicin and tetracycline. Production of extended-spectrum β -lactamase was evaluated using a double-disk synergy test [12], with negative results.

Isolate 154 was from the sputum of a patient aged 80 years who was hospitalised in the internal medicine ward. Whole-cell DNA of *Acinetobacter* sp. isolate 154 was tested by PCR using primers specific for *bla*_{IMP} and *bla*_{VIM} [13], giving rise to a *bla*_{VIM}-positive amplicon. Sequencing performed using a GeneAmp PCR system 9700 (AB Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) revealed that isolate 154 possessed *bla*_{VIM-4}. PCR combinations using the 5'-CS, 3'-CS and *bla*_{VIM} primers [14] revealed that *bla*_{VIM-4} was part of a class 1 integron, being the second gene cassette after the *aacA4* gene encoding the AAC(6')-Ib acetyltransferase. In order to determine the exact location of the *bla*_{VIM-4}-containing integron, an I-CeuI-restriction experiment was performed [15]; this revealed that the *bla*_{VIM-4} gene was chromosomally located (Fig. 1). No additional *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-40}, *bla*_{OXA-58} or *bla*_{OXA-51}-type carbapenemase genes were present in isolate 154 according to the results of PCR assays [16].

Precise identification of isolate 154 to the species level using a genotypic approach revealed that this strain belonged to *Acinetobacter* genomospecies 16, and not to *A. baumannii*, as was suggested by initial identification results based on the use of biochemical techniques. This result was in accord with the failure to detect the intrinsic *bla*_{OXA-51}-like gene of *A. baumannii* in this isolate.

In conclusion, this is the first report of the identification of the MBL VIM-4 determinant in *Acinetobacter* spp., which emphasises the fact that carbapenem-hydrolysing class D β -lactamases are not the sole factor leading to the emergence of resistance to carbapenems in this genus. Interestingly, *bla*_{VIM-4} was identified in a non-*A. baumannii* isolate, thereby indicating that non-clinically significant Gram-negative species may also be reservoirs of MBL-encoding genes. Also noteworthy is the occurrence of VIM-4 in *Acinetobacter* in a country in which VIM-4 has been reported previously in *P. aeruginosa*. Thus, as observed previously with *bla*_{VIM-1} in Greece, this is yet another example of resistance genes known to be widespread in *P. aeruginosa* apparently crossing the species barrier to reach *Acinetobacter* spp.

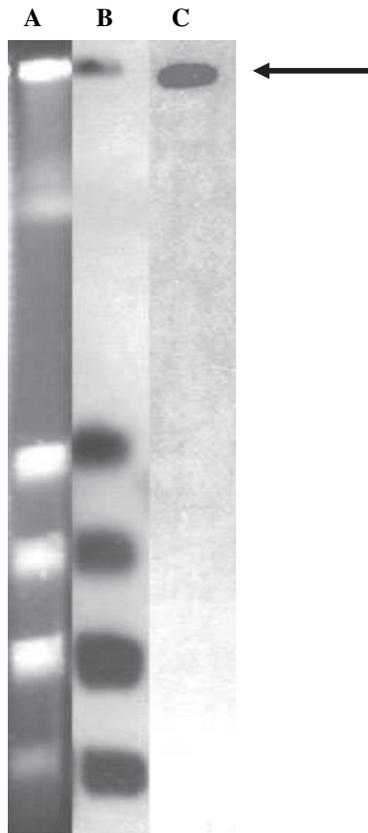


Fig. 1. (A) Pulsed-field gel electrophoresis profile of I-CeuI-digested whole-cell DNA of *Acinetobacter* genome-species 16 isolate 154. Southern hybridization was performed with a 16S–23S rRNA gene-specific probe (B) and a *bla*_{VIM}-specific internal probe (C). The arrow indicates the band for which a co-hybridisation signal was obtained.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded, in part, by a grant from the Ministère de l'Éducation Nationale et de la Recherche (UPRES-EA3539), Université Paris XI, France and primarily by a grant from the European Community (LSHM-CT-2005-018705). The authors declare that they have no conflicting interests in relation to this work.

S. Figueiredo, L. Poirel*, A. Papa, V. Koulourida and P. Nordmann

Service de Bactériologie-Virologie,
INSERM U914,
'Emerging Resistance to Antibiotics',
Hôpital de Bicêtre,
Assistance Publique/Hôpitaux de Paris,
Faculté de Médecine Paris-Sud,
Université Paris XI, K.-Bicêtre, France
*E-mail: laurent.poirel@bct.aphp.fr

REFERENCES

1. Wroblewska MM, Towner KJ, Marchel H, Luczak M. Emergence and spread of carbapenem-resistant strains of *Acinetobacter baumannii* in a tertiary-care hospital in Poland. *Clin Microbiol Infect* 2007; **13**: 490–496.
2. Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect* 2006; **12**: 826–836.
3. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 2005; **18**: 306–325.
4. Lee K, Lee WG, Uh Y, Ha GY, Cho J, Chong Y. VIM- and IMP-type metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. in Korean hospitals. *Emerg Infect Dis* 2003; **9**: 868–871.
5. Toleman MA, Jones RN, Walsh TR. Hospital outbreak of an imipenem-resistant VIM-2 encoding *Acinetobacter* DNA group 14TU strain in a German teaching hospital. *Clin Microbiol Infect* 2004; **10** (suppl 3): 48–49.
6. Tsakris A, Ikonomidis A, Pournaras S *et al.* VIM-1 metallo- β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis* 2006; **12**: 981–983.
7. Luzzaro F, Docquier JD, Colinson C *et al.* Emergence in *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* clinical isolates of the VIM-4 metallo- β -lactamase encoded by a conjugative plasmid. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 648–650.
8. Pournaras S, Maniati M, Petinaki E *et al.* Hospital outbreak of multiple clones of *Pseudomonas aeruginosa* carrying the unrelated metallo- β -lactamase gene variants *bla*_{VIM-2} and *bla*_{VIM-4}. *J Antimicrob Chemother* 2003; **51**: 1409–1414.
9. Deshpande LM, Jones RN, Fritsche TR, Sader HS. Occurrence and characterization of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2000–2004). *Microb Drug Resist* 2006; **12**: 223–230.
10. Pournaras S, Tsakris A, Maniati M, Tzouveleki LS, Maniatis AN. Novel variant (*bla*_{VIM-4}) of the metallo- β -lactamase gene *bla*_{VIM-1} in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; **46**: 4026–4028.
11. Ibrahim A, Gerner-Smidt P, Liesack W. Phylogenetic relationship of the twenty-one DNA groups of the genus *Acinetobacter* as revealed by 16S ribosomal DNA sequence analysis. *Int J Syst Bacteriol* 1997; **47**: 837–841.
12. Poirel L, Menuteau O, Agoli N, Cattoen C, Nordmann P. Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. *J Clin Microbiol* 2003; **41**: 3542–3547.
13. Poirel L, Naas T, Nicolas D *et al.* Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**: 891–897.
14. Lévesque C, Piché L, Larose C, Roy PH. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; **39**: 185–191.
15. Liu SL, Hessel A, Sanderson KE. Genomic mapping with I-CeuI, an intron-encoded endonuclease specific for genes for ribosomal RNA, in *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, and other bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 6874–6878.
16. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM *et al.* Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents* 2006; **27**: 351–353.

◆ Résumé de la thèse

La résistance aux carbapénèmes au sein du genre *Acinetobacter*, rapportée de manière croissante dans le monde entier, est le plus souvent liée à la production de β -lactamases de type oxacillinase à activité de carbapénémase (CHDLs), plus rarement de métallob β -lactamases (MBLs). Nous avons montré qu'un certain nombre d'espèces du genre *Acinetobacter* possèdent naturellement sur leur chromosome des gènes codant pour des CHDLs et en constituent donc le réservoir. La MBL VIM-4 a été identifiée pour la première fois dans une souche de *Acinetobacter* spp.

◆ Mots clés

Acinetobacter spp ; résistance ; β -lactamases ; carbapénémases ; oxacillinases

◆ Laboratoire de rattachement

Unité INSERM U914 « Résistances émergentes aux antibiotiques ».

Service de Bactériologie-Virologie-Parasitologie-Hygiène, CHU de Bicêtre.

Assistance Publique-Hôpitaux de Paris. Faculté de Médecine et Université Paris-Sud.

78 rue du Général Leclerc, 94275 Le Kremlin-Bicêtre.

PÔLE : MICROBIOLOGIE / THÉRAPEUTIQUES ANTIINFECTIEUSES

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11
UFR «FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY »
5, rue Jean Baptiste Clément
92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex