

Etude de l'épidémiologie moléculaire et de l'écologie d'Acinetobacter spp au Liban

Ahmad Al Atrouni

▶ **To cite this version:**

Ahmad Al Atrouni. Etude de l'épidémiologie moléculaire et de l'écologie d'Acinetobacter spp au Liban. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers; Université libannaise de Beyrouth, 2017. Français. NNT : 2017ANGE0004 . tel-01599268

HAL Id: tel-01599268

https://theses.hal.science/tel-01599268

Submitted on 2 Oct 2017

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.

UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

Université Libanaise
Ecole Doctorale
Sciences et Technologie

université angers

Thèse de Doctorat

AHMAD AL ATROUNI

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Docteur de l'Université d'Angers sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

École doctorale : *Ecole Doctorale Biologie Santé*
Discipline : *Microbiologie*
Spécialité : *Microbiologie*
Unité de recherche : ATOMycA, Inserm Atip-Avenir Team, CRCNA, Inserm U892, 6299 CNRS, Angers, France

ET

L'Université Libanaise
École doctorale : *Sciences et Technologie*
Spécialité :*Microbiologie Medicale et Alimentaire*
Unité de recherche: *Laboratoire de Microbiologie Santé et Environnement*

Soutenue le *19 Mai 2017*
Thèse N° : 132430

Etude de l'épidémiologie moléculaire et de l'écologie d'*Acinetobacter spp* au Liban

JURY

Rapporteurs	**Jean Yves MADEC**, Directeur de recherche, Anses, Lyon **Ghassan MATAR**, Professeur des Universités, Université Américaine de Beirut
Examinateurs	**Jean Marc ROLAIN,** Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Université Aix Marseille **Ziad DAOUD**, Professeur des Universités, Université de Balamand,
Directeur de Thèse	**Marie KEMPF,** Maître de Conférence des Universités-Praticien Hospitalier, Université d'Angers **Monzer HAMZE**, Professeur des Universités, Faculté de santé publique, Université Libanaise

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné(e) Ahmad AL ATROUNI
déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet, constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.
En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce rapport ou mémoire.

signé le 22 / 02 / 2017



DEDICACES

A cœur vaillant rien d'impossible
A conscience tranquille tout est accessible

Quand il y a la soif d'apprendre
Tout vient à point à qui sait attendre

Quand il y a le souci de réaliser un dessein
Tout devient facile pour arriver à nos fins

Malgré les obstacles qui s'opposent
En dépit des difficultés qui s'interposent

Souhaitant que le fruit de mes efforts fournis
Jour et nuit, me mènera vers le bonheur fleuri

Aujourd'hui, ici rassemblé auprès des jurys,
Je prie Dieu que cette soutenance
Fera signe de persévérance

Je dédie ce travail …

À mes chers parents
Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être.
Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder la santé et le bonheur

A mes chers frères et sœurs
Nos conseillers, et amis fidèles, qui m'ont assisté dans les moments difficiles

A mes chers amis
Avec qui j'ai partagé des moments inoubliables, et nous sommes devenus une entité, une famille.

Remerciements

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements

A Mes directeurs de thèse au Liban Pr. Monzer HAMZE et en France Dr. Marie KEMPF pour la confiance qu'ils m'ont accordée, leurs remarques et leurs conseils judicieux. Je leur suis reconnaissant de m'avoir fait bénéficier tout au long de ce travail de leurs grandes compétences, leur rigueur intellectuelle, leur dynamisme, et leur efficacité. Soyez assuré de mon attachement et de ma profonde gratitude.

Aux membres de jury, Dr Jean Yves MADEC, Pr Ghassan MATAR, Pr Jean Marc ROLAIN, et Pr Ziad DAOUD pour l'honneur qu'ils m'ont accordé d'avoir accepté d'évaluer ce travail

A madame le Pr Marie Laure JOLY GUILLOU pour m'avoir accueilli dans le laboratoire pour commencer cette thèse

A tous les membres du laboratoire Microbiologie Santé et Environnement pour leur aide précieux, leur accueil chaleureux et leur encouragement. Je remercie vivement Pr.Fouad DABBOUSSI, Dr Marwan OSMAN, Dr Bachar ISMAIL,Dr Imad AL KASSAA, Dr Rayane Rafei, Dr Dima EL SAFADI, et les techniciens Taha ABDO, Majd MOUZAWAK, Sara AMRIEH, Mariam YEHYA, Farah OBEID, Iman DARWICH et Asmaa ALLOUCH.

A tous les membres du service de bactériologie du Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, en particulier à Dr Carole LEMARIE et les techniciens Catherine QUINQUENEAU, Catherine RAMONT et Viviane CASSICA.

A tous les membres du laboratoire ATOMycA, Inserm Atip-Avenir, Pr Mathieu EVEILLARD, Dr Laurent MARSOLIER, Dr Estelle MARION, Marie

Robe SAULE, Jeremie BABONNEAU et Amelie POUCHIN pour leur sollicitude et la bonne ambiance que j'ai beaucoup appréciées.

A monsieur le professeur Vincent PROCACIO pour sa gentillesse, ses conseils, et les discussions scientifiques qui m'ont beaucoup apporté.

A Dr David GOUDENEGE pour son patience, et son aide précieux dans la partie bioinformatique durant la 3ème année de thèse

A monsieur le professeur Alexandre NEMEC et madame le docteur Lenka KRISOVA pour leur collaboration dans la partie « taxonomie des Acinetobacter ». je vous en serai toujours reconnaissant.

A mes collègues Mohamad DIAB, Juliano HADDAD et Racha BAHRI avec qui j'ai partagé des moments inoubliables depuis le M2 jusqu'à la fin de cette thèse

A mes amis que j'ai eu le plaisir de les rencontrer à Angers. Un grand Merci à Abdallah DIB, Joseph KHOURY, Zaher SAYEGH, et Bachar MOUGHET pour m'avoir encouragé dans les moments difficiles.

A mes chers amis au Liban qui étaient une source de motivation pendant mon doctorat

A l'Université Libanaise et le Conseil National de la Recherche Scientifique (CNRS) au Liban pour leur soutien financier

Sommaire

SOMMAIRE 1
LISTE DES ABREVIATIONS 4
LISTE DES TABLEAUX 7
LISTE DES FIGURES 7
INTRODUCTION GENERALE 8
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 12
I. LE GENRE *ACINETOBACTER* : HISTORIQUE ET TAXONOMIE ACTUELLE 12
II. CARACTERISTIQUES BACTERIOLOGIQUES DU GENRE *ACINETOBACTER* 17
1. Caractéristiques morphologiques 17
2. Caractéristiques biochimiques 17
3. Caractéristiques culturales 17
III. IDENTIFICATION DES *ACINETOBACTER* 18
1. Identification phénotypique 18
2. Identification moléculaire 19
2.1. Méthodes d'identifications basées sur l'analyse de fragments d'ADN après électrophorèse 20
2.1.1. Amplified Ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) 20
2.1.2. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) 20
2.1.3. Le ribotypage 21
2.2. Méthodes ciblant un gène spécifique 21
2.2.1. PCR ciblant le gène *bla*$_{\text{OXA-51-like}}$ 21
2.2.2. PCR ciblant le gène *gyr*B 22
2.2.3. PCR ciblant les gènes *rec*A et l'espaceur intergénique *ADNr* 16S-23S 22
2.3. Méthodes basées sur l'analyse d'une séquence d'ADN 23
2.3.1. Séquençage du gène de l'ADN ribosomal 16S 23
2.3.2. Séquençage du gène *rpo*B 23
2.3.3. Séquençage de l'espaceur intergénique 16S-23S de l'ADN ribosomal 24
IV. PATHOGENICITE D'*ACINETOBACTER* 24
1. Pathogénicité d'*A.baumannii* 25
1.1. Pneumopathies 25
1.2. Bactériémies 25
1.3. Infections de la peau et des tissus mous 26
1.4. Infections urinaires 26
1.5. Méningites 26
1.6. Autres manifestations 26
2. Pathogenicité des *Acinetobacter* non *baumannii* 27
V. MODES DE TRANSMISSION 28
VI. TECHNIQUES DE TYPAGE D'*A.BAUMANNII* 29
1. Electrophorèse en Champs Pulsé (ECP) 30
2. Single Locus Sequence Typing (S-LST) 31
3. Trilocus Sequence Typing (3-LST) 32
4. Multi-Locus SequenceTyping (MLST) 32
5. AFLP 34
6. Ribotypage 34
7. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) 35
8. Repetitive Extragenic Palindromic (REP) - PCR 35

9. Multiple Locus Variable Number of Tandem Repeat Analysis (MLVA) 36
10. Multilocus PCR/Electrospray Ionization Mass Spectrometry (PCR-ESI-MS) 37
11. Typage par la Spectrométrie de Masse (MALDI-TOF MS) 37
12. Typage par Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR typing) 38
13. Séquençage du génome complet 39
VII. EPIDEMIOLOGIE EXTRAHOSPITALIERE 42
1. *A.baumannii* 42
1.1. Environnement 42
1.2. Produits alimentaires 42
1.3. Portage chez l'homme 43
1.4. Les animaux 43
2. Réservoirs extrahospitaliers des *Acinetobacter* non *baumannii* 44
3. Liens possibles entre les réservoirs extrahospitaliers et les infections 45
VIII. FACTEURS DE VIRULENCE D'*A.BAUMANNII* 46
1. La protéine de la membrane externe OmpA 46
2. Le Lipopolysaccharide 46
3. La capsule 47
4. Les phospholipases 47
5. Les systèmes de sécrétion 47
6. L'acquisition de fer 48
7. Formation de biofilm 48
8. Autres facteurs de virulence 49
IX. EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE D'*A.BAUMANNII* 51
1. Clone international 2 51
2. Clone international 1 52
3. Clone international 3 53
4. Autres clones 53
X. EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE D'*A.BAUMANNII* AU LIBAN 54
XI. MECANISMES DE RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES 55
1. Résistance acquise aux ß -lactamines 56
1.1. Mécanismes enzymatiques 56
1.1.1. Les ß-lactamase classe A 56
1.1.2. Les ß-lactamases Classe B 57
1.1.3. Les ß-lactamases de Classe C 60
1.1.4. Les ß-lactamases Classe D 60
2. Mécanismes non enzymatiques 63
2.1.1. Diminution de la perméabilité membranaire 64
2.1.2. Les pompes à efflux 64
2.1.3. Modification des Protéines Liant les Pénicillines (PLP) 64
3. Résistance acquise aux aminosides 69
4. Résistance acquise aux quinolones 70
5. Résistance acquise aux cyclines et à la glycylcycline 70
6. Résistance acquise à la rifampicine 70
7. Résistance acquise aux polymyxines 71
XII. OPTIONS THERAPEUTIQUES 71
XIII. REVUE « RESERVOIRS OF NON *BAUMANNII ACINETOBACTER* SPECIES » 73
1. Introduction 74
2. Commentaires 87
I. EPIDEMIOLOGIE HOSPITALIERE D'*ACINETOBACTER* SPP 88
1. Introduction 88
2. Article 1: Widespread of OXA-23 producing carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* belonging to the clonal complex II in different hospitals in Lebanon 90

3. Article 2: Emergence of NDM-1 and OXA-72 producing *Acinetobacter pittii* clinical isolates in Lebanon 99
4. Commentaires 102
II. ECOLOGIE D'*ACINETOBACTER* SPP AU LIBAN 104
1. Introduction 104
2. Article 3: Diversity of *Acinetobacter* species isolated from different environments in Lebanon: a nationwide study 106
3. Article 4: First report of OXA-72 producing *Acinetobacter calcoaceticus* in Lebanon 117
4. Commentaires 120
III. CARACTERISATION D'UNE PUTATIVE NOUVELLE ESPECE D'*ACINETOBACTER* 122
1. Introduction 122
2. Article 5: Proposal of *Acinetobacter libanensis* sp.nov,. a novel geographically widespread species isolated from livestock animals and found in soil and water ecosystems 123
DISCUSSION GENERALE 132
CONCLUSION ET PERSPECTIVES 142
REFERENCES 144

Liste des abréviations

3-LST	3 locus sequence typing
AAC	Aminoside acetyl transferase
ADC	*Acinetobacter* derived cephalosporinase
ADN	Acide desoxyribonucléique
AFLP	Amplified fragment length polymorphism
ANT	Aminoside nucleotidyl transferase
APT	Aminoside phospho transferase
ARDRA	Amplified ribosomal DNA restriction analysis
ARN	Acide ribonucléique
Ata	*Acinetobacter* trimeric autotransporter
ATCC	American Type Culture Collection (Etats-Unis)
BAP	Biofilm associated protein
BJ	Bouvet et Jeanjean
Bla	ß-lactamase
BLSE	ß-lactamase à spectre étendu
CC	Clonal complex
CHDL	Carbapenem hydrolyzing class D ß-lactamase
EC	European clones
ECP	Electrophorèse en champ pulsé
ERIC-PCR	Enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR
ESAC	Extended spectrum cephalosporinase
ESI-MS	Electrospray-ionisation mass spectrometry
gen.sp	Genomspecies ou espèces génomiques
IS	Sequence d'insertion

IVD	*In vitro* diagnosis
LAM	Leeds Acinetobacter Medium
LDC	Lysin decarboxylase
LPS	Lipopolysaccharide
MALDI-TOF	Matrix- assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry
MATE	Multidrug and toxic compound extrusion
MBL	Metallo-ß-lactamases
MDR	Multi-drug resistant
MLST	Multilocus sequence typing
MLVA	Multiple locus variable number of tandom repeat analysis
ODC	Ornithin decarboxylase
OMP	Outer membrane protein
OMV	Outer membrane vesicule
OXA	Oxacillinase
Pb	Paires de bases
PCR	Polymerase chain reaction
PFGE	Pulsed field gel electrophoresis
PLP	Proteins de liaison des pénicillines
QRDR	Quinolone resistance determining region
RAPD	Random amplified polymorphic DNA
REP-PCR	Repetitive extragenic palindromic PCR
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RND	Resistance nodulation cell division
RUO	Research use only
SG	Sequence group
SLST	Single locus sequence based typing
SNP	Single nucleotide polymorphism

ST	Sequence type
T2SS	Systeme de secretion de type 2
TLR	Toll like receptor
TU	Tjemberg & Ursing
UTI	Urinary tract infections
VIH	Virus de l'immunodeficience humain
VNTR	Variable number of tandem repeats
WGS	Whole genome sequencing
WW	Worldwide clone

Liste des tableaux

Tableau 1: Classification et nomenclature du genre *Acinetobacter* 14

Tableau 2: Tableau récapitulant les principales techniques utilisées pour le typage d'*A.baumannii* 40

Tableau 3: Principaux facteurs de virulence rapportés chez *A.baumannii* 50

Tableau 4: Récapitulatif des différentes ß-lactamases décrites chez *Acinetobacter* spp 65

Tableau 5: Les principaux clones d'*A.baumannii* caractérisés par plusieurs techniques de typage 54

Tableau 6:Recapitulatif des STs décrits chez *A.baumannii* en dehors d'un contexte infectieux 141

Liste des figures

Figure 1:Représentation graphique des zones conservées et hypervariables du gène *rpo*B 24

Figure 2: Cartographie de la dissémination mondiale des Métallo-ß-lactamases 59

Figure 3:Cartographie de la dissémination mondiale du gène $bla_{\text{OXA-23-like}}$ 63

Figure 4: Cartographie de la dissémination d'autres Oxacillinases 63

Figure 5: Dissémination mondiale des clones internationaux majeurs d'*A.baumannii* 53

Figure 6: Analyse de la population d'*A.baumannii* par eBurst 140

Introduction générale

Les *Acinetobacter* sont des bactéries opportunistes et ubiquitaires qui se présentent sous la forme de coccobacilles à Gram négatif. Parmi les espèces de ce genre, *Acinetobacter baumannii* est la plus incriminée dans les infections nosocomiales, notamment au sein des unités de soins intensifs (Peleg *et al.*, 2008). Cette bactérie est impliquée dans un large éventail des infections telles que les pneumopathies acquises sous ventilation, les bactériémies, les infections urinaires, les surinfections de plaies ou encore les méningites post opératoires (Antunes *et al.*, 2014; Howard *et al.*, 2012). Ces infections sont souvent liées à des facteurs de risque comme les antécédents de chirurgie, les séjours en unité de soins intensifs, les antécédents d'antibiothérapie et la présence de matériel invasif (ventilation mécanique, sonde urinaire, cathéters intravasculaires) (Visca *et al.*, 2011). Néanmoins, le rôle des *Acinetobacter* non *baumannii* dans les infections humaines est de plus en plus décrit, particulièrement depuis l'introduction des techniques moléculaires pour l'identification de ces espèces (Espinal *et al.*, 2011).

A.baumannii présente une capacité remarquable à acquérir des mécanismes de résistance aux antibiotiques, conduisant rapidement à une multi-résistance et parfois à des impasses thérapeutiques. Ainsi, elle fait partie du groupe des bactéries « ESKAPE » pour *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter* spp, classées par l'Organisation Mondiale de la Santé comme les plus inquiétantes sur le plan de la résistance (Howard *et al.*, 2012; Potron *et al.*, 2015). Concernant les autres *Acinetobacter*, des souches cliniques multi-résistantes ont également été décrites ces dernières années (Al Atrouni *et al.*, 2016a; Espinal *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2015b). Ainsi, la prise en charge des infections est devenue un véritable problème de santé publique dans de nombreux pays. La production des enzymes rendant les antibiotiques inactifs constitue un mécanisme majeur de résistance chez *Acinetobacter* spp. Ces enzymes sont codées par des gènes souvent présents sur les éléments génétiques mobiles y compris les séquences d'insertion, les plasmides, les transposons et les intégrons (Almasaudi, 2016; Potron *et al.*, 2015).

Enfin, une importante caractéristique d'*A.baumannii* est son pouvoir épidémiogène. Celui-ci est en rapport avec sa tolérance à la dessiccation. En effet, cette bactérie est capable de survivre pendant de longues périodes dans l'environnement humide ou sec (Eveillard et Joly-Guillou, 2012). La persistance de cette bactérie dans l'environnement du patient, associée à la transmission par l'intermédiaire des mains du personnel au contact des patients, expliquent l'ampleur et la durée des phénomènes épidémiques.

A.baumannii est également responsable des infections communautaires dont les pneumopathies, qui sont les plus rapportées, notamment dans les régions tropicales et subtropicales du globe. Ces infections sont souvent décrites chez des sujets âgés, diabétiques, cancéreux, ou présentant une broncho-pneumopathie chronique obstructive. Des infections post-traumatiques dues à *A.baumannii* ont également été rapportées notamment chez les soldats blessés dans les zones de conflits armés en Iraq, Afghanistan et Syrie, mais également chez des survivants des catastrophes naturelles, notamment suite à des tremblements de terre ou des tsunamis (Eveillard and Joly-Guillou, 2012; Eveillard *et al.*, 2013; O'Shea, 2012; Rafei *et al.*, 2014a).

Parallèlement aux études s'intéressant à l'épidémiologie chez l'homme, de nombreuses publications ont montré l'existence de réservoirs extrahospitaliers d'*Acinetobacter* spp (Al Atrouni *et al.*, 2016b). Ainsi, ces bactéries ont la capacité d'occuper diverses niches écologiques y compris les zones contaminées par les hydrocarbones, les boues actives, les eaux usées, l'eau de source ou encore les sols. De même, des études ont rapporté la présence de ces bactéries sur des végétaux, dans des produits alimentaires, chez des arthropodes, mais également chez des individus sains et des animaux à l'état de colonisation (Al Atrouni *et al.*, 2016b; Eveillard *et al.*, 2013). Cependant, l'implication de ces réservoirs dans la transmission de ces bactérie et le rôle potentiel de ces dernières dans les infections communautaires et la transmission ne sont pas bien élucidées et restent encore un sujet à débat du fait que dans la majorité des cas, les clones caractérisés sont souvent différents de ceux isolés en pratique clinique.

Objectif de la thèse

Ce travail de thèse s'est développé dans le cadre d'un projet collaboratif mené entre le laboratoire de Microbiologie Santé et Environnement à l'Université Libanaise (Liban) et le laboratoire ATOMycA, Inserm Atip-Avenir Team à l'Université d'Angers (France). L'objectif

global de ce présent travail a été d'étudier l'épidémiologie hospitalière et extrahospitalière d'*Acinetobacter* spp au Liban.

Vue globale des différentes parties de la thèse

La **première partie** de la thèse, divisée en deux chapitres, est consacrée à une étude bibliographique sur *Acinetobacter* spp. Dans le premier chapitre, nous avons développé la taxonomie actuelle de ce genre bactérien, les différents outils phénotypiques et moléculaires utilisés pour l'identification et le typage, l'impact clinique, l'écologie, les facteurs de virulence, les mécanismes de résistance aux antibiotiques, l'épidémiologie moléculaire, et enfin, les options thérapeutiques. Le second chapitre présente les réservoirs extrahospitaliers des *Acinetobacter* non *baumannii*. Il est intitulé « Reservoirs of non *baumannii Acinetobacter* species » et a été publié sous forme d'une revue dans le journal « Frontiers in Microbiology » (impact factor 4.165).

La **deuxième partie** de la thèse, consacrée au travail expérimental, est divisée en trois axes de recherche :

1) Le ***premier axe*** « ***Epidémiologie hospitalière d'Acinetobacter* spp** », tente de dresser un portrait de l'épidémiologie moléculaire des infections dues à *Acinetobacter* spp au Liban, et plus particulièrement à Beyrouth et dans la région Nord du Liban, en ciblant plusieurs hôpitaux. Ce travail a été valorisé par deux articles publiés dans des revues internationales.

   L'article 1 décrit les caractéristiques épidémiologiques et les mécanismes moléculaires de résistance aux carbapénèmes d'une collection de 119 souches d'*A.baumannii* isolées de plusieurs hôpitaux surtout à Beyrouth et Tripoli, au nord du Liban. Cette étude a été publiée sous forme d'un « article de recherche intitulé « **Wide spread of OXA-23 producing carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* belonging to the clonal complex II in different hospitals in Lebanon** » dans le journal « International Journal of Infectious diseases » (impact factor 2.229).

   L'article 2 rapporte la première détection de deux souches cliniques d'*A.pittii* résistantes aux carbapénèmes et portant les gènes $bla_{\text{NDM-1}}$ et $bla_{\text{OXA-72}}$. Cette étude a été publiée sous forme d'un « First clinical case report » intitulé « **Emergence of NDM-1 and OXA-72 producing *Acinetobacter pittii* clinical isolates in Lebanon »** dans le journal « New Microbes New Infections ».

2) Le ***deuxième axe « Ecologie d'Acinetobacter*** spp ***au Liban »***, vise à investiguer plusieurs niches écologiques au Liban pour la présence d'*Acinetobacter* dans le but de caractériser des réservoirs potentiels de ces bactéries, mais aussi d'identifier les différents clones d'*A.baumannii* circulant en dehors des hôpitaux. Ce travail a également été valorisé par deux articles publiés dans des revues internationales.

   L'article 3 représente une grande étude épidémiologique rapportant les prévalences d'*Acinetobacter* spp dans une collection de 2361 échantillons extrahospitaliers isolés de l'environnement, de produits alimentaires, d'animaux et d'individus sains. Cette étude a été publiée sous forme d'un « article de recherche » intitulé « **Diversity of *Acinetobacter* species isolated from different environments in Lebanon : a nationwide study** » dans le journal « Future Microbiology » (Impact factor 3.637).

   L'article 4 faisant partie de l'étude précédente, décrit la première détection au Liban des souches d'*Acinetobacter calcoaceticus* résistantes aux carbapénèmes isolées sur des végétaux consommables. Cette observation a fait l'objet d'une publication sous forme d'une « letter to the editor » intitulée « **First report of OXA-72 producing *Acinetobacter calcoaceticus* in Lebanon »** dans le journal « New Microbes New Infections ».

3) Le troisième axe « **Caractérisation d'une putative nouvelle espèce d'*Acinetobacter*** », vise à poursuivre l'identification des souches d'*Acinetobacter* précédemment décrites au Liban et non identifiées au rang d'espèce en utilisant diverses approches taxonomiques. Ce travail est en cours de réalisation en collaboration avec le laboratoire de génétique bactérienne (Prague, République du tchèque).

La troisième partie comprend une discussion générale et une conclusion suivie de perspectives de ce travail de recherche.

Etude bibliographique

I. Le genre *Acinetobacter* : historique et taxonomie actuelle

L'histoire du genre *Acinetobacter* a débuté avec le microbiologiste néerlandais (Martinus Willem Beijerinck) qui a isolé en 1911, une souche bactérienne dénommée *Micrococcus calcoaceticus* à partir d'un prélèvement de sol enrichi dans un milieu minimum contenant l'acétate et le calcium (Beijerinck, 1911). La caractérisation de cette souche a été poursuivie avec Brisou et Prévot en 1954, et le nom *Acinetobacter* a été proposé pour séparer les bactéries immobiles des bactéries mobiles du genre *Achromobacter* (Brisou and Prevot, 1954). Ce genre a regroupé une collection hétérogène des bactéries à Gram négatif, immobiles, à réaction d'oxydase négative ou positive. En 1971, suite aux travaux de Baumann et ses collaborateurs (Baumann *et al.*, 1968), la sous-comité pour la taxonomie des *Moraxella* et ses bactéries apparentées a déclaré que le genre *Acinetobacter* devait inclure uniquement les espèces à oxydase négative. En 1984, le genre *Acinetobacter* a été officiellement inclus dans la taxonomie mondiale après son apparition sur la liste approuvée des espèces bactériennes (Approved Lists of Bacterial Names) et dans le manuel Bergey's de Bactériologie systématique (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology) (Jung and Park, 2015). Cependant, une description détaillée des espèces appartenant à ce genre n'a pas été prévue avant 1986 où seules deux espèces ont été dénommées, *Acinetobacter calcocaceticus* pour les souches oxydant le glucose et *Acinetobacter lwoffii* pour les souches n'oxydant pas le glucose (Jung and Park, 2015; Seifert and Dijkshoorn, 2008).

La première étude taxonomique moderne du genre *Acinetobacter* a été réalisée par Bouvet et Grimont en 1986. Ils ont fourni une description de plusieurs espèces y compris *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter johnsonii* et *Acinetobacter junii* et ont modifié la description d'*A.calcoaceticus* et d'*A.lwoffii* en se basant sur des tests biochimiques, les besoins nutritifs des souches ainsi que sur des preuves d'hybridation ADN-ADN (Bouvet and Grimont, 1986). La taxonomie du genre *Acinetobacter* a ainsi été confuse en raison du manque de marqueurs biochimiques capables de distinguer les espèces bactériennes. Aussi, des désignations provisoires « espèces génomiques ou genomic species » ont été largement

utilisées. Le nom des espèces génomiques dérive du nom des auteurs (par ex *Acinetobacter* genomic species 13TU a été proposé par Tjernberg et Ursing, Ac.gen.sp 13 TU a été proposé par Tjernberg et Ursing) (Seifert and Dijkshoorn, 2008). Plus tard, des travaux tentant de définir des espèces distinctes à partir des espèces génomiques ont été réalisés, et les noms validés *Acinetobacter bereziniae, Acinetobacter guillouiae, Acinetobacter pittii,* et *Acinetobacter nosocomialis* ont été attribués aux espèces génomiques BJ10, BJ11, BJ3, et 13TU respectivement (Nemec *et al.*, 2010, 2011). De même, certaines espèces avaient des noms synonymes comme gen.sp 9 et *A.lwoffii*, gen. sp 12 et *A.radioresistens*, gen.sp 14TU et gen.sp 13BJ, *A.grimontii* et *A.junii* (Dijkshoorn and Nemec, 2008; Seifert and Dijkshoorn, 2008) ainsi qu'*A.ursingii* et *A.septicus* (Nemec *et al.*, 2008).

Depuis la description des premiers membres du genre *Acinetobacter*, plusieurs espèces ont été rapportées. Ce genre bactérien est formé actuellement de **71 espèces dont 53 portent des noms propres et officiels** (Tableau 1). Il convient de noter que la taxonomie de ce genre reste encore un défi aujourd'hui, surtout que les analyses phénotypiques utilisées en pratique courante dans les laboratoires de routine ne sont pas capables de détecter des différences minimes au niveau de certaines espèces (Peleg *et al.*, 2008). C'est le cas du complexe *A.calcoaceticus-A.baumannii* (Acb) qui comprend 6 espèces phénotypiquement très proches: *A.baumannii, A.pittii, A.nosocomialis* et *A.calcoaceticus* (Chan *et al.*, 2012) ainsi que les nouvelles espèces *A.seifertii et A.dijkshoorniae* (Cosgaya *et al.*, 2016; Nemec *et al.*, 2015). Récemment, les données du génome entier ont été incluses dans les analyses taxonomiques, et les chercheurs ont ainsi pu réussir à délimiter les espèces génomiques d'*Acinetobacter*. Cependant, l'application de ces données sans recours aux études phénotypiques n'a jamais été validée, ni acceptée.

Le genre *Acinetobacter* appartient actuellement au domaine des *Bacteria*, phylum des *Proteobacteria,* classe des *Gammaproteobacteria,* ordre des *Pseudomonodales* et est classé dans la famille des *Moraxellaceae* (Doughari *et al.*, 2011).

Tableau 1 : Classification et nomenclature du genre *Acinetobacter*

Validly published names (n-53)	Cultured (mainly) from	References
A.albensis	Soil, water	(Krizova *et al.*, 2015a)
A.apis	Honey bee intestine	(Kim *et al.*, 2014a)
A.baumannii	Human, animals	(Bouvet and Grimont, 1986)
A.baylyi	Activated sludge, soil	(Carr *et al.*, 2003)
A.beijerinckii	Human, animals, soil, water	(Nemec *et al.*, 2009)
A.bereziniae	Human	(Bouvet and Grimont, 1986; Nemec *et al.*, 2010)
A.bohemicus	Soil, water	(Krizova *et al.*, 2014; Touchon *et al.*, 2014)
A.boissieri	Floral nectar	(Álvarez-Pérez *et al.*, 2013)
A.bouvetii	Activated sludge	(Carr *et al.*, 2003)
A.brisouii	Peat	(Anandham *et al.*, 2010)
A.calcoaceticus	Soil, water, human	(Bouvet and Grimont, 1986)
A.celticus	Soil, water	(Radolfova-Krizova *et al.*, 2016a)
A.courvalinii	Human, animals	(Bouvet and Jeanjean, 1989; Nemec *et al.*, 2016)
A.dispersus	Soil, water, human	(Bouvet and Jeanjean, 1989; Nemec *et al.*, 2016)
A.dijkshoorniae/ =A.lactucae	Human, water, lettuce	(Cosgaya *et al.*, 2016; Rooney *et al.*, 2016)
A.equi	Horse	(Poppel *et al.*, 2015)
A.gandensis	Horse, cattle, water	(Smet *et al.*, 2014)
A.gerneri	Activated sludge	(Carr *et al.*, 2003)
A.grimontii	Activated sludge	(Carr *et al.*, 2003; Vaneechoutte *et al.*, 2008)
A.guangdongensis	Lead-zinc ore	(Feng *et al.*, 2014b)
A.guillouiae	Soil, water, human	(Bouvet and Grimont, 1986; Nemec *et al.*, 2010)
A.gyllenbergii	Human	(Nemec *et al.*, 2009)
A.haemolyticus	Human	(Bouvet and Grimont, 1986)
A.harbinensis	River water	(Li *et al.*, 2014a)
A.indicus	Soil	(Malhotra *et al.*, 2012)
A.johnsonii	Soil, water, human, animals	(Bouvet and Grimont, 1986)
A.junii	Human, animals, water, soil	(Bouvet and Grimont, 1986)
A.koukii	Soil, water	(Choi *et al.*, 2013)

Validly published names (continued)	Cultured (mainly) from	References
A.lactucae	Lettuce	(Rooney *et al.*, 2016)
A.lwoffii	Human, animal, soil, water	(Bouvet and Grimont, 1986)
A.modestus	Human, water	(Nemec *et al.*, 2016; Touchon *et al.*, 2014)
A.nectaris	Floral nectar	(Álvarez-Pérez *et al.*, 2013)
A.nosocomialis	Human	(Nemec *et al.*, 2011; Tjernberg and Ursing, 1989)
***A.pakistanensis* (=*A.bohemicus*)**	Wastewater	(Abbas *et al.*, 2014; Nemec and Radolfova-Krizova, 2016)
A.parvus	Human, animals	(Nemec *et al.*, 2003)
A.pittii	Human, soil, water	(Bouvet and Grimont, 1986; Nemec *et al.*, 2011)
A.populi	Populus bark	(Li *et al.*, 2015c)
A.pragensis	Soil, water	(Radolfova-Krizova *et al.*, 2016b)
A.proteolyticus	Human	(Nemec *et al.*, 2016; Touchon *et al.*, 2014)
A.puyangensis	Populus bark	(Li *et al.*, 2013)
A.qingfengensis	Populus bark	(Li *et al.*, 2014b)
A.radioresistens	Human, soil, cotton	(Bouvet and Grimont, 1986; Nishimura *et al.*, 1988)
A.rudis	Raw milk, wastewater	(Vaz-Moreira *et al.*, 2011)
A.schindleri	Human, animals	(Nemec *et al.*, 2001)
A.seifertii	Human	(Gerner-Smidt and Tjernberg, 1993; Nemec *et al.*, 2015)
A.soli	Human, soil	(Kim *et al.*, 2008)
A.tandoii	Activated sludge, water, soil	(Carr *et al.*, 2003)
A.tjembergiae	Activated sludge	(Carr *et al.*, 2003)
A.towneri	Activated sludge, water, soil	(Carr *et al.*, 2003)
A.ursingii	Human	(Nemec *et al.*, 2001)
A.variabilis	Human, animals, soil	(Krizova *et al.*, 2015b)
A.venetianus	Salt water	(Di Cello *et al.*, 1997; Vaneechoutte *et al.*, 2009)
A.vivianii	Human, soil, water	(Nemec *et al.*, 2016; Touchon *et al.*, 2014)

Species Name ahead of print in IJSEM (n=3)	**Cultured (mainly) from**	**References**
A.larvae	Moth larval gut	(Liu *et al.*, 2016)
A.defluvii	Hospital sewage	(Hu *et al.*, 2017)
A.colistiniresistens	Human	(Nemec *et al.*, 2017)
Tentative species designations (n=6)	**Cultured (mainly) from**	**References**
Genomic sp. 6	Human	(Bouvet and Grimont, 1986)
Genomic sp. 15BJ	Human	(Bouvet and Jeanjean, 1989)
Genomic sp. 16	Human	(Bouvet and Jeanjean, 1989)
Taxon 21	Human	(Touchon *et al.*, 2014)
Taxon 22	Human	(Touchon *et al.*, 2014)
Taxon 23	Soil, water, animals, human	(Touchon *et al.*, 2014)
Effectively but not validly published names (n=10)	**Cultured (mainly) from**	**References**
A.antiviralis	Tobacco plant roots	(Lee *et al.*, 2009a)
A.halotolerans	Soil	(Dahal *et al.*, 2017)
A.kyonggiensis	Sewage treatment plant	(Lee and Lee, 2010)
A.marinus	Sea water	(Yoon *et al.*, 2007)
A.oleivorans	Soil	(Kang *et al.*, 2011)
A.oryzae	Rice	(Chaudhary *et al.*, 2012)
***A.plantarum* (=*A.junii*)**	Wheat	(Du *et al.*, 2016)
A.refrigeratoris	Refrigerator	(Feng *et al.*, 2014a)
***A.seohaensis* (*A.towneri*)**	Sea water	(Yoon *et al.*, 2007)
***A.septicus* (= *A.ursingii*)**	Human	(Kilic *et al.*, 2008; Nemec *et al.*, 2008)

II. Caractéristiques bactériologiques du genre *Acinetobacter*

1. Caractéristiques morphologiques

Le genre *Acinetobacter* comprend des bacilles ou coccobacilles dont la structure de la paroi cellulaire est typique des bactéries Gram négatif. Cependant, ces bactéries résistent parfois à la décoloration de Gram en retenant le crystal violet et peuvent donc être mal identifiées, comme des cocci Gram positif (Doughari *et al.*, 2011). Ce sont des bactéries asporulées, parfois capsulées, souvent groupées en paires mais aussi en chaînes de longueur variable. Dans la phase exponentielle de croissance, leur diamètre varie typiquement de 0,9 à 1,6 μm et leur longueur de 1,5 à 2,5 μm. Elles deviennent plus coccoides dans la phase stationnaire (Doughari *et al.*, 2011; Jung and Park, 2015). Bien que ces bactéries soient généralement considérées comme immobiles, une mobilité de type « mouvement par tremblement » ou « twitching motility » a été remarquée notamment sur des supports semi-solides (Roca *et al.*, 2012).

2. Caractéristiques biochimiques

Les *Acinetobacter* sont des bactéries présentant des réactions de catalase positive et d'oxydase négative, et n'ont pas la capacité de métaboliser les sucres par les voies fermentaires (Kurcik-Trajkovska, 2010; Vaneechoutte *et al.*, 2011). Par ailleurs, la majorité des tests biochimiques utilisés habituellement en bactériologie clinique sont négatifs : indole, réduction des nitrates en nitrites, décarboxylase pour la lysine (LDC), décarboxylase pour l'ornithine (ODC), production d'hydrogène sulfuré (H_2S), bêta-galactosidase et DNase. Les tests de l'uréase, l'hydrolyse de la gélatine ou la phénylalanine désaminase (PAD) donnent quant à eux des réponses variables (Doughari *et al.*, 2011; Hawkey and Bergogne-Berezin, 2006).

3. Caractéristiques culturales

Les *Acinetobacter* sont des bactéries aérobies strictes, prototrophes, non fastidieuses, facilement cultivables sur la plupart des milieux ordinaires dans les laboratoires cliniques (Kurcik-Trajkovska, 2010). La plupart des espèces se multiplie bien à des températures d'incubation de 20 à 37°C, avec des températures optimales de croissance situées entre 33 et 35°C (Doughari *et al.*, 2011). Les isolats cliniques d'*Acinetobacter* présentent une bonne

croissance à une température de 37°C et certaines souches peuvent se développer à des températures élevées (Seifert and Dijkshoorn, 2008).

Sur gélose au sang, les colonies apparaissent généralement non pigmentées, lisses ou muqueuses (lorsque la capsule est présente), opaques, de couleur blanche ou crémeuse, avec un diamètre de 1-2 mm après 18-24h d'incubation à 37°C. Par ailleurs, certaines espèces n'appartenant pas au complexe *A.calcoaceticus-A.baumannii* présentent un caractère hémolytique (Bergogne-Bérézin, 2008).

Des milieux sélectifs ont été développés pour faciliter la détection des *Acinetobacter* comme par exemple le milieu Leeds *Acinetobacter* medium (LAM) commercialisé par Hardy Diagnostics (Etats-Unis) (colonies roses pour le genre *Acinetobacter*) ou encore le milieu CHROMagar commercialisé par Chromagar (France) (colonies rouges pour le genre *Acinetobacter*) (Ajao *et al.*, 2011; Jawad *et al.*, 1994). Enfin, certains milieux d'enrichissement minimum à base de l'acétate et de nitrate ont été utilisés pour faire pousser les *Acinetobacter* à partir de prélèvements environnementaux tels que l'eau ou encore le sol (Doughari *et al.*, 2011).

III. Identification des *Acinetobacter*

1. Identification phénotypique

L'identification phénotypique au rang d'espèce du genre *Acinetobacter* est difficile. Les galeries biochimiques commercialisées (API 20NE, RapID NF) ou encore les systèmes automatisés (Vitek 2, Phoenix) utilisés dans la plupart des laboratoires de microbiologie clinique ne sont pas efficaces pour l'identification et en particulier ne permettent pas de distinguer les espèces du complexe *A.calcoaceticus-A.baumannii* (Peleg *et al.*, 2008; Seifert and Dijkshoorn, 2008). Ainsi, une étude irlandaise publiée en 2009 a montré que 75% des souches d'*Acinetobacter* étudiées ont été mal identifiées par Vitek 2 (Boo *et al.*, 2009). Ces résultats ont récemment été confirmés par une autre étude qui a montré une identification correcte au rang d'espèce pour seulement 35,9% des *Acinetobacter* (Lee *et al.*, 2014). Ainsi, ces difficultés d'identification sont à l'origine d'une sous-estimation de l'implication de beaucoup d'espèces autres qu'*A.baumannii* en pathologie humaine.

La spectrométrie de masse connue par MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry), est une technique protéomique apparue il y a quelques années et utilisée pour l'identification rapide des bactéries dans les laboratoires de microbiologie clinique. Cette méthode a pour principe l'identification des espèces bactériennes par analyse de leur composition en protéines notamment les protéines ribosomales et celles associées aux membranes. Les protéines bactériennes préalablement ionisées sont séparées en fonction de leur rapport masse/charge puis détectées selon leur temps de vol. Les résultats sont présentés sous forme d'un spectre de masse. Celui-ci est caractéristique de chaque espèce et est comparé aux spectres d'une base de données (Patel, 2013). Trois automates ont été commercialisés : le MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Germany), le Vitek MS (bioMérieux, France) et l'Andromas (Andromas SAS, France).

Le MALDI Biotyper a montré un potentiel pour la différenciation des espèces au sein du complexe *A.calcoaceticus-A.baumannii* malgré des difficultés rencontrées parfois pour *A.nosocomialis* et *A.baumannii*. Ceci a été du à la similarité des spectres de ces espèces et au manque de spectres d'*A.nosocomialis* dans la base de données (Alvarez-Buylla *et al.*, 2012). Plus tard, plusieurs études ont visé à l'amélioration de l'identification des espèces du complexe sur cet automate. Ainsi, l'inclusion des spectres d'*A.nosocomialis* et l'optimisation des protocoles ont pu résoudre ces problèmes d'identification (Espinal *et al.*, 2012; Sousa *et al.*, 2014).

Un autre automate, le VITEK MS, est utilisable selon 2 modes de fonctionnement : un mode IVD (*In Vitro* Diagnosis) pour le diagnostic de routine, un mode RUO (Research Use Only) avec une base de données ouverte pour des applications de recherche. Or, aucun de ces deux modes ne permet une identification satisfaisante des espèces appartenant au complexe *A.calcoaceticus-A.baumannii* (Manji *et al.*, 2014). En 2015, Pailhories *et al.* ont pu enrichir la base de donnée SARAMIS^{TM} (mode RUO) par des spectres de référence et des super spectres pour chaque espèce de ce complexe, ce qui a permis une identification rapide et fiable (Pailhoriès *et al.*, 2015a).

2. Identification moléculaire

L'utilisation d'outils de biologie moléculaire reste le meilleur moyen pour pallier la mauvaise identification phénotypique des espèces du genre *Acinetobacter*. La technique d'hybridation ADN–ADN représente la méthode de référence. Cependant, elle est

contraignante et disponible seulement dans des laboratoires de référence (Dijkshoorn and Nemec, 2008). D'autres outils moléculaires ont été développés et utilisés. Parmi ces techniques, il existe celles qui sont basées sur la comparaison des fragments d'ADN obtenus après séparation par électrophorèse, celles basées sur l'amplification d'un gène spécifique, ou celles basées sur l'analyse de fragments d'ADN séquencés. Nous présentons ici les principales techniques utilisées.

2.1. Méthodes d'identifications basées sur l'analyse de fragments d'ADN après électrophorèse

2.1.1. Amplified Ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA)

L'ARDRA est une technique basée sur l'amplification d'un locus spécifique suivie d'une restriction enzymatique et d'une séparation des fragments obtenus par migration sur gel d'électrophorèse (Ahmed and Alp, 2015). Cette méthode est validée et peut être utilisée pour l'identification des *Acinetobacter*. Cinq types d'enzymes sont utilisés, *Cfo*I, *Alu*I, *Mbo*I, *Rsa*I et *Msp*I. Pour l'identification, les profils obtenus sont comparés à une base des données renfermant les profils décrits pour les espèces connues (Dijkshoorn and Nemec, 2008; Seifert and Dijkshoorn, 2008). Le gène le plus couramment étudié est celui qui code l'ADN ribosomal 16S.

L'ARDRA est une technique peu coûteuse, utilisable facilement et avec une bonne reproductibilité inter-laboratoires. Cependant, elle peut s'avérer insuffisamment discriminante, et certains profils peuvent co-exister avec différentes espèces d'*Acinetobacter*. De même, des variations intra-espèces peuvent être observées. L'étude d'autres gènes tels que l'espaceur intergénique ADNr 16S-23S et le gène *rec*A ont été proposés comme alternative (Ahmed and Alp, 2015; Dijkshoorn and Nemec, 2008; Seifert and Dijkshoorn, 2008; Vaneechoutte *et al.*, 1995).

2.1.2. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

L'AFLP est une technique d'empreinte génétique de toute molécule d'ADN indépendamment de son origine. Elle est très utile pour l'identification des *Acinetobacter,* notamment les espèces du complexe Acb. Cette technique consiste à digérer l'ADN par 2 enzymes de restriction, puis à réaliser une ligation d'adaptateurs aux fragments de restriction. Ensuite, une amplification sélective de ces fragments est réalisée avec des amorces spécifiques,

puis les amplicons sont séparés par migrations sur gel d'électrophorèse. L'AFLP est une méthode d'identification performante, validée, ayant une bonne capacité de discrimination. Cependant, elle requiert du temps et des compétences techniques ainsi qu'une standardisation rigoureuse. En outre, les profils générés sont difficilement comparables entre les laboratoires (van Belkum *et al.*, 2007; Rafei *et al.*, 2014b; Seifert and Dijkshoorn, 2008) (van Belkum *et al.*, 2007; Rafei *et al.*, 2014b).

2.1.3. Le ribotypage

Le ribotypage détecte le polymorphisme génétique présent au sein des gènes codant pour les ARN ribosomaux (ARNr). Son efficacité dans l'identification et le génotypage des souches bactériennes a déjà été prouvée. Dans cette technique, l'ADN est digéré avec des enzymes de restriction puis les fragments sont séparés par électrophorèse et transférés sur une membrane. Il s'en suit une hybridation avec une sonde marquée spécifique. Des marqueurs non radioactifs sont utilisés ce qui rend cette technique facile à réaliser dans un laboratoire de microbiologie bien équipé (Bouchet *et al.*, 2008). Les ribotypes ainsi générés peuvent être spécifiques d'une espèce ou même d'une souche bactérienne (Ahmed and Alp, 2015; Bouchet *et al.*, 2008).

L'identification des espèces d'*Acinetobacter* par cette technique a été initiée par Gerner-Smidt qui a utilisé l'*Eco*RI, *Cla*I, et *Sal*I comme enzymes de restriction et le digoxenin-11-UTP comme une sonde pour l'ARNr (Gerner-Smidt, 1992). Cette technique a été automatisée et commercialisée sous le nom de Riboprinter^{TM} (DuponQualicon, Etats Unis) et a été largement utilisée dans plusieurs études avec l'enzyme *Eco*RI. Bien que le ribotypage soit laborieux, cette méthode est robuste pour l'identification des *Acinetobacter* avec une bonne corrélation avec l'ARDRA et l'AFLP. Les résultats peuvent être comparés entre les laboratoires et les espèces d'*Acinetobacter* peuvent être différenciées (Ahmed and Alp, 2015; van Dessel *et al.*, 2004).

2.2. Méthodes ciblant un gène spécifique

2.2.1. PCR ciblant le gène *bla*$_{\text{OXA-51-like}}$

Ce gène, naturellement présent sur le chromosome d'*A.baumannii*, code pour une enzyme qui est l'oxacillinase. En 2006, il a été utilisé pour la première fois comme un marqueur pour l'identification spécifique d'*A.baumannii*, dans une étude réalisée par Turton *et al.* Puis, la détection de ce gène a été largement appliquée pour le diagnostic de cette espèce (Evans and Amyes, 2014; Turton *et al.*, 2006a). Cependant, cette méthode peut s'avérer quelque fois

imparfaite car certaines études ont rapporté des mutations dans ce gène et d'autres ont mis en évidence sa présence chez d'autres espèces *d'Acinetobacter* (Lee *et al.*, 2012; Lopes *et al.*, 2012; Zander *et al.*, 2013).

La détection d'autres oxacillinases intrinsèques comme $bla_{\text{OXA-134}}$, $bla_{\text{OXA-211}}$, $bla_{\text{OXA-213}}$, $bla_{\text{OXA-214}}$, $bla_{\text{OXA-228}}$ a été suggérée comme outil pour l'identification des espèces *A.lwoffii*, *A.schindleri*, *A.johnsonii*, *A.calcoaceticus*, *A.haemolyticus* et *A.bereziniae* respectivement (Kamolvit *et al.*, 2014).

2.2.2. PCR ciblant le gène *gyr*B

Cette méthode utilise la variabilité au niveau du gène *gyr*B codant pour la sous unité ß de l'ADN gyrase, pour différencier certaines espèces d'*Acinetobacter*. Une première PCR multiplexe a été proposée pour identifier *A.baumannii* et *A.nosocomialis*. Elle utilise 2 jeux d'amorces, Sp4F et Sp4R, pour lesquels les deux espèces produisent un amplicon de 294 pb, et Sp4R et Sp2F, pour lesquels seul *A.baumannii* produit un amplicon supplémentaire, de 490 bp (Higgins *et al.*, 2007). Une autre PCR multiplexe a été décrite pour différencier les deux autres espèces du complexe *A.pittii* et *A.calcoaceticus*. Cette nouvelle PCR utilise deux paires d'amorces, D16 et D8 qui permettent d'amplifier un fragment de 194 pb et identifier *A.pittii*, alors que l'autre paire D14 et D19 produit un amplicon de 428 pb qui identifie *A.calcoaceticus* (Higgins *et al.*, 2010a). Cette approche semble utile et reproductible, et facilement utilisable. En outre, elle permet de discriminer efficacement les espèces appartenant au complexe Acb. Ainsi, dans une étude réalisée sur 495 isolats cliniques d'*Acinetobacter*, il a été montré que 448 isolats ont été correctement identifiés en donnant des résultats concordants avec d'autres techniques moléculaires (Lee *et al.*, 2014).

2.2.3. PCR ciblant les gènes *rec*A et l'espaceur intergénique ADNr 16S-23S

C'est une technique de PCR multiplexe utilisant deux pairs d'amorces : une paire amplifiant une région de 425 pb du gène de la recombinase A (*rec*A) et permettant l'identification du genre *Acinetobacter*, et une autre paire amplifiant un fragment de 208 pb de la région ITS spécifique d'*A.baumannii*. Cette technique est d'utilisation très limitée car elle permet d'identifier les souches uniquement au niveau du genre (Chen *et al.*, 2007; Chiang *et al.*, 2011).

2.3. Méthodes basées sur l'analyse d'une séquence d'ADN

2.3.1. Séquençage du gène de l'ADN ribosomal 16S

Le gène ADNr 16S est universellement présent chez les bactéries et couramment utilisé dans les études taxonomiques et phylogénétiques (Janda and Abbott, 2007). Son séquençage permet également l'identification d'espèces lors du diagnostic microbiologique de routine. Une espèce est définie lorsqu'un groupe de souches partage plus de 98,7% d'homologie au niveau des séquences d'ADN codant pour l'ADNr 16S.

Chez *Acinetobacter*, l'utilité de ce gène est un sujet de débat du fait de divergences détectées (Nemec *et al.*, 2011; Seifert and Dijkshoorn, 2008). Il a par exemple été montré dans une étude évaluant cette technique chez des souches types et de référence que les valeurs de similarité des séquences variaient entre 94,1% et 99,6%, avec seulement 3,7% des valeurs au-dessus du seuil taxonomique de 98,7% (Dijkshoorn and Nemec, 2008). Au sein du complexe Acb, une autre étude a rapporté que la similarité des séquences entre les espèces non *baumannii* pouvait varier entre 98,9 et 99,0%, rendant ainsi leur discrimination difficile par cette technique (Nemec *et al.*, 2011). Dans une étude similaire, Chan *et al.* ont montré que cette technique était incapable de différentier correctement les espèces du genre même avec une valeur cut-off au-delà de 99% (Chan *et al.*, 2012). Pour que cette technique d'identification soit plus discriminante, Vaneechoutte et De Baere ont proposé de nouveaux seuils d'identification : sur une longueur de 1300 pb, une similarité minimum de 99.7 % doit être obtenue pour définir l'identité de l'espèce (Vaneechoutte and De Baere, 2008). Ces observations mettent en évidence que cette approche n'est pas toujours suffisante pour l'identification de toutes les espèces d'*Acinetobacter*.

2.3.2. Séquençage du gène *rpo*B

Le séquençage du gène *rpo*B, codant pour la sous-unité ß de l'ARN polymérase semble être très utile pour l'identification des espèces du genre *Acinetobacter*. La Scola *et al.* ont montré la présence de deux zones polymorphiques nommées 1 et 2, de taille de 350 et 450 pb au sein du gène, et de deux zones variables adjacentes à l'extrémité du gène, appelées zones *rplL-rpo*B (301-310 pb) et *rpo*B-*rpo*C (86-177 pb) (figure 1). Il a été proposé de séquencer la zone 1 comme un schéma rapide pour l'identification des *Acinetobacter* (séquençage partiel du gène *rpo*B) (La Scola *et al.*, 2006). Cette zone a été validée par Gundi *et al.* en 2009. Cette technique s'avère très discriminante. En effet, la similarité inter-espèces des séquences de zone

1 au sein de complexe *A.calcoaceticus-A.baumannii* est située entre 88,3 % et 96,9%, tandis que la similarité intra-espèces est entre 98,0 et 100% pour *A.baumannii*, *A.pittii* et *A.nosocomialis*, et entre 98,6 et 100% pour *A.calcoaceticus* (Gundi *et al.*, 2009). L'utilité de séquencer cette zone a également été démontrée par d'autres études ultérieures (Karah *et al.*, 2011a; Lee *et al.*, 2014). Cependant, cette technique ne permet pas toujours à elle seule d'identifier certaines espèces atypiques qui circulent en dehors des hôpitaux (Al Atrouni *et al.*, 2016c; Rafei *et al.*, 2015a).

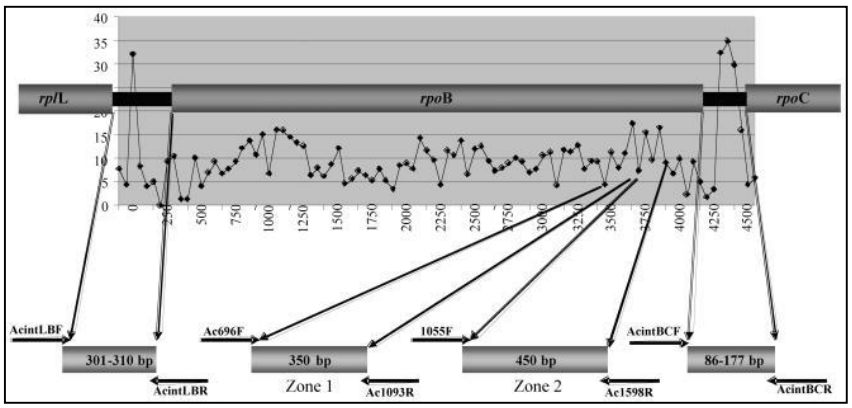


Figure 1: Représentation graphique des zones conservées et hypervariables du gène *rpo*B

(La Scola *et al.*, 2006)

2.3.3. Séquençage de l'espaceur intergénique 16S-23S de l'ADN ribosomal

Le polymorphisme de la région située entre le gène codant la sous-unité 16S de l'ADN ribosomal et celui codant la sous-unité 23S, région aussi appelée espaceur intergénique 16S-23S a été mis à profit pour discriminer les espèces appartenant au complexe Acb. En effet, la similarité intra-espèces des séquences de cette région au sein de ce complexe varie entre 0,99 et 1 alors que la similarité inter-espèces varie entre 0,86 et 0,92 (Chang *et al.*, 2005).

IV. Pathogénicité d'*Acinetobacter*

Au sein du genre *Acinetobacter*, *A.baumannii* est devenu au cours de ces dernières décennies un agent pathogène cliniquement pertinent, impliqué dans un large éventail d'infections. Néanmoins, le rôle des *Acinetobacter* non *baumannii* dans les infections humaines est de plus en plus reconnu, et cela grâce à l'introduction dans les laboratoires des techniques de biologie moléculaire, permettant une identification fiable des bactéries au niveau de l'espèce (Al Atrouni *et al.*, 2016b; Karah *et al.*, 2011a; Kishii *et al.*, 2014).

1. Pathogénicité d'*A.baumannii*

1.1. Pneumopathies

Les pneumopathies chez les patients ventilés représentent aujourd'hui les infections à *A.baumannii* les plus fréquentes en unités de soins intensifs. Une étude américaine du National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) a rapporté 5 à 10 % de pneumopathies dues à *A.baumannii* dans les unités de soins intensifs (Gaynes *et al*., 2005). Des facteurs de risque en faveur du développement d'une pneumopathie acquise sous ventilation ont été identifiés. Il s'agit d'un contexte de neurochirurgie, un traumatisme crânien, un syndrome de détresse respiratoire aiguë, une inhalation importante ou encore une antibiothérapie préalable (Baraibar *et al.*, 1997 ; Garnacho-Montero *et al.*, 2005).

A.baumannii peut également être à l'origine de pneumonies communautaires, survenant surtout en zone tropicale (Asie et Australie). Ces infections sont fréquemment observées chez l'homme et sont associées avec des facteurs de risque comme l'âge, le tabagisme, l'alcoolisme, la bronchite chronique, le diabète, le cancer et les antécédents de pneumonie. Les pneumonies communautaires sont généralement fulminantes, avec un taux de mortalité qui peut dépasser les 60% en raison d'un retard de prise en charge thérapeutique adaptée (Falagas and Rafailidis, 2007; Peleg *et al.*, 2008; Whitman *et al.*, 2008).

1.2. Bactériémies

A.baumannii peut être à l'origine de bactériémies qui sont le plus souvent la conséquence de la présence de cathéters ou autres dispositifs implantables. Dans une étude réalisée aux Etats Unis, il a été rapporté que la bactérie était impliquée dans 1,3% des bactériémies nosocomiales (Cisneros and Rodríguez-Baño, 2002). Ces infections sont plus rencontrées dans les services de soins intensifs que dans d'autres services. Le taux de mortalité résultant de ces infections est de l'ordre de 16% en dehors de soins intensifs, alors qu'il peut varier entre 34 et 43% dans les services de soins intensifs (Cisneros and Rodríguez-Baño, 2002; Garnacho-Montero *et al.*, 2015; Peleg *et al.*, 2008).

1.3. Infections de la peau et des tissus mous

A.baumannii est responsable de près de 2% des infections de la peau et des tissus mous acquises dans les unités de soins intensifs (Almasaudi, 2016).

Ce germe était également l'un des microorganismes les plus fréquemment isolés des plaies chez les survivants des catastrophes naturelles. Il a été retrouvé dans des plaies chez des patients victimes de séismes en Marmara-Turquie en 1999, au Pakistan en 2005, en Wenchuan-chine, ainsi que du tsunami de l'océan indien en 2004 (Eveillard *et al.*, 2013). D'autre part, *A.baumannii* a également été retrouvé chez les patients issus des zones de conflits armés tel qu'en Iraq, et Afghanistan (O'Shea, 2012). Il était le germe le plus fréquemment isolé des victimes de guerre ayant des fractures ouvertes de tibia (Falagas *et al.*, 2015). Récemment, des souches multi-résistantes ont été isolées de plaies des blessés de guerre en Syrie et hospitalisés à l'hopital gouvernemental de Tripoli, Nord du Liban (Rafei *et al.*, 2014a, 2015b).

1.4. Infections urinaires

A.baumannii peut être impliqué mais rarement dans les infections urinaires. Selon une étude, il serait responsable de moins de 2% des infections urinaires acquises dans les services de soins intensifs. L'infection est en lien avec la présence d'une sonde urinaire (Falagas *et al.*, 2015; Peleg *et al.*, 2008).

1.5. Méningites

Les méningites nosocomiales post chirurgicales causées par des souches multi-résistantes d'*A.baumannii* ont été rapportées (Basri *et al.*, 2015; Doughari *et al.*, 2011). La bactérie a été impliquée dans 4% des cas de méningites nosocomiales chez les adultes. La mortalité peut être aussi élevée que 70%, bien que sa cause soit souvent difficile à discerner (Basri *et al.*, 2015; Peleg *et al.*, 2008).

1.6. Autres manifestations

A.baumannii peut être la cause d'endocardites dont la majorité est liée à l'utilisation de valves prothétiques. Il peut aussi être à l'origine de péritonites, d'ophtalmies ou encore de kératites post chirurgies (Peleg *et al.*, 2008).

2. Pathogenicité des *Acinetobacter* non *baumannii*

De nombreuses études supportent le fait que les espèces proches d'*A.baumannii* jouent un rôle important en pathologie humaine et sont de plus en plus impliquées dans les infections nosocomiales (Espinal *et al.*, 2011). Ainsi, dans les services de soins, divers épidémies d'*Acinetobacter* ont été décrites dont les agents responsables étaient *A.pittii* ou *A.nosocomialis* (van Dessel *et al.*, 2002; Horrevorts *et al.*, 1995; Idzenga *et al.*, 2006). Dans une large étude portant sur 584 souches cliniques d'*Acinetobacter* spp, Seifert et ses collaborateurs ont rapporté que, malgré la prédominance d'*A.baumannii*, 9.4% des souches étudiées étaient des *A.pittii*, 4.9% des *A.johnsonii* et 3.6% des *A.lwoffii* (Seifert *et al.*, 1993). Dans une autre étude réalisée en Italie, *A.pittii* représentait 5.6% des infections dues aux *Acinetobacter* spp (Donnarumma *et al.*, 2010). Dans d'autres pays encore, la situation a été différente. Quelques études ont rapporté des prévalences plus élevées d'infections causées par *A.pittii* (26% et 39 %) (Boo *et al.*, 2009; van den Broek *et al.*, 2009).

Plusieurs études ont été réalisées à Taiwan, en Corée et au Japon pour évaluer les bactériémies dues aux *Acinetobacter* spp. Les auteurs ont montré que les *Acinetobacter* non *baumannii* étaient impliqués dans approximativement 46, 50 et 82% des cas respectivement. Les espèces fréquemment isolées étaient *A.pittii* et *A.nosocomialis* dont certaines souches étaient résistantes aux carbapénèmes (Kishii *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2013). Dans une étude norvégienne similaire, Karah *et al.* ont rapporté que 91% des hémocultures positives à *Acinetobacter* étaient des non *baumannii* et *A.pittii* et *A.nosocomialis* étaient les espèces majoritairement isolées (Karah *et al.*, 2011a). Aux Etats Unis, dans une étude réalisée par Fitzpatrick *et al.* au sein d'un centre médical, les *Acinetobacter* non *baumannii* étaient impliqués dans 21% des cas de bactériémies. *A.pittii* était l'espèce la plus fréquemment isolée et 17% des souches était multi- résistantes (Fitzpatrick *et al.*, 2015).

Une étude réalisée par Molina *et al.* a montré qu'*A.pittii* était plus fréquemment retrouvé chez des patients hospitalisés hors réanimation ou en ambulatoire, et à partir de prélèvements superficiels (abcès ou plaies), alors qu'*A.baumannii* était significativement plus souvent isolé chez des patients de réanimation (Molina *et al.*, 2010).

Diverses études ont montré que d'autres espèces génomiques d'*Acinetobacter* spp pouvaient également être impliquées dans des infections chez l'homme. Ainsi, *A.lwoffii* a été décrit comme étant responsable d'infections communautaires et nosocomiales de type

endocardites, endophtalmies, méningites et péritonites (Espinal *et al.*, 2011; Fu *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014). Dans une étude réalisée au Royaume-Uni et en Irlande, il a été montré que 8.8% des *Acinetobacter* analysés étaient des *A.lwoffii* (essentiellement des bactériémies), 4% des *A.ursingii*, 1.7% *A.pittii* et *A.johnsonii* (Turton *et al.*, 2010).

Dans une étude réalisée au Japon, Endo *et al.* ont montré que 81% des bactériémies étaient dues à des *Acinetobacter* non *baumannii,* et que *A.soli* était l'espèce la plus fréquemment isolée (27%), suivie d'*A.nosocomialis* (25%) et *A.ursingii* (17%) (Endo *et al.*, 2014). De même, *A.ursingii* a été rapporté plusieurs fois comme agent responsable de bactériémies, en obstétrique et en néonatologie (Horii *et al.*, 2011; Máder *et al.*, 2010).

A.haemolyticus a été décrit comme agent responsable d'endocardite et de diarrhée sanglante avec production de Shiga toxine (Castellanos Martínez *et al.*, 1995; Grotiuz *et al.*, 2006). *A.johnsonii* a été associé à des bactériémies secondaires à des infections de cathéter (Seifert *et al.*, 1993). *A.radioresistens* a un rôle pathogène décrit en cas d'immunodépression, avec un cas clinique rapporté de bactériémie chez une patiente infectée par le virus de l'immunodéficience humaine (Visca *et al.*, 2001).

A.junii a été décrit comme responsable de bactériémie et de sepsis en réanimation néonatale et en oncologie pédiatrique (de Beaufort *et al.*, 1999; Kappstein *et al.*, 2000).

A.septicus a été impliqué dans des cas de bactériémies associées à une épidémie dans une unité de soins intensifs néonatale en Turquie (Kilic *et al.*, 2008).

A.calcoaceticus, qui fait partie du complexe *A.calcoaceticus-A.baumannii* et qui est généralement considéré plutôt comme un germe de l'environnement, a été la cause de plusieurs cas de pneumonies sévères en Chine (Li *et al.*, 2015b; Sun *et al.*, 2014) avec des souches multi-résistantes aux antibiotiques. De même, ce germe a été impliqué dans un cas de bactériémie en Brésil avec une souche résistante aux carbapénèmes (Mostachio *et al.*, 2012).

V. Modes de transmission

Comme nous l'avons vu précédemment, *A.baumannii* est une bactérie opportuniste impliquée dans un large éventail d'infections. Cette bactérie a une capacité de survie importante en milieu hospitalier, elle est facilement transmise d'un patient à un autre et peut même diffuser d'un hôpital à un autre, comme cela a été le cas au début des années 2000 dans le nord de la France. Ainsi, une épidémie a débuté en septembre 2003, au cours de laquelle quatre hôpitaux d'une même région dans le nord de la France ont rapporté l'isolement de souches

d'*A.baumannii* qui avaient toutes le même profil de résistance aux antibiotiques. Ces souches produisaient une ß-lactamase à spectre étendu de type VEB-1 qui a conféré la résistance à toutes les pénicillines, les céphalosporines à spectre étendu et les monobactams. Cette épidémie a ensuite diffusé dans 53 hôpitaux (Naas *et al.*, 2006). Depuis, des centaines d'épidémies ont déjà été rapportées à travers le monde.

La transmission d'*A.baumannii* est souvent due à une contamination de l'environnement hospitalier, à une dissémination aérienne et aux patients colonisés. Le manuportage est le principal mode de transmission (Almasaudi, 2016). Cette bactérie est très résistante à la dessiccation. Elle est capable de survivre plus de dix jours sur les surfaces sèches (Getchell-White *et al.*, 1989). Les sites environnementaux contaminés sont souvent ceux situés à proximité des patients colonisés, comme par exemple les oreillers, le linge de lit, les appareils de ventilation, les éviers, les poignées des portes, les claviers des ordinateurs, les équipements de nettoyage... (Jung and Park, 2015; Karageorgopoulos and Falagas, 2008).

Les mains des personnels de soins peuvent aussi être colonisées par des souches épidémiques d'*A.baumannii* facilitant par conséquent la transmission aux patients. Des études épidémiologiques ont montré que le pourcentage de colonisation des mains des infirmiers et les médecins variait de 3 à 23% (Almasaudi, 2016; Karageorgopoulos and Falagas, 2008).

A.baumannii peut être transmise par l'intermédiaire des patients colonisés. Cette transmission est favorisée par la multiplicité des sites de colonisation chez le patient, la contamination de l'environnement, ou encore la persistance sur les surfaces et les mains pour des longues périodes (Almasaudi, 2016; Karageorgopoulos and Falagas, 2008).

VI. Techniques de typage d'*A.baumannii*

A.baumannii est caractérisée par des capacités remarquables à acquérir les déterminants de la résistance aux antibiotiques, à diffuser au sein et entre les hôpitaux et à disséminer au niveau national et international (Peleg *et al.*, 2008). La dissémination de cette bactérie pose des problèmes aux établissements de santé parce que des infections sont difficiles à traiter d'une part, et d'autre part, parce que l'éradication de la bactérie de l'environnement hospitalier et la prévention de transmission nécessitent des mesures de contrôle solides, y compris l'isolement

des patients et la fermeture temporaire de certains services (Perez *et al.*, 2007). Ainsi, la compréhension des caractéristiques moléculaires des souches constitue une stratégie clé pour suivre les épidémies et contrôler leurs propogations. Afin d'étudier les épidémies dues à *A.baumannii*, de nombreuses techniques de typage ont été développées au cours de temps. Chacune de ces techniques a son principe, ses avantages et ses inconvénients. Nous allons détailler dans ce chapitre les techniques les plus utilisées (Tableau 2).

1. Electrophorèse en Champs Pulsé (ECP)

Malgré l'évolution des nouvelles approches basées sur la PCR et le séquençage, l'Electrophorèse en Champs Pulsé (ECP) ou le PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) reste souvent citée comme la technique de référence pour le typage d'*A.baumannii* (Rafei *et al.*, 2014b; Zarrilli *et al.*, 2013). Dans cette méthode, le génome bactérien est digéré par des enzymes de restriction puis les grands fragments d'ADN subissent une migration sur un gel d'agarose pour être séparés grâce à un champ électrique pulsé qui change alternativement de direction. Le choix des enzymes de restriction est un facteur clé dans cette technique qui a un impact notamment sur la qualité des résultats, l'analyse et la reproductibilité. Les enzymes les plus utilisées pour le typage d'*A.baumannii* sont *Apa*I et *Sma*I et les gels résultants sont généralement analysés par des logiciels (Ahmed and Alp, 2015; Rafei *et al.*, 2014b). Concernant l'interprétation des résultats,Tenover *et al.* ont proposé certaines recommandations. Les souches sont classées comme non distinguables lorsqu'aucune différence n'est observée entre les profils de 2 isolats. Les isolats sont définis comme reliés de manière proche lorsqu'il existe uniquement 2 ou 3 différences de bandes, comme possiblement reliés lorsqu'il existe 4 à 6 différences, et comme différents lorsque 7 différences de bandes au moins sont notées (Tenover *et al.*, 1995). Dans la plupart des études, les souches sont considérées généralement comme appartenant à un même clone lorsqu'une similarité supérieure à 80% est détectée entre les profils (Rafei *et al.*, 2014b).

L'ECP est une technique qui possède un pouvoir discriminant important et elle est très efficace pour la comparaison des souches isolées dans un contexte d'épidémie locale qui se produit dans un intervalle de temps bien déterminé (Cetin *et al.*, 2009; Rafei *et al.*, 2014b). Cependant, elle n'est pas la méthode de choix pour les études épidémiologiques à grande échelle (Hamouda *et al.*, 2010; Rafei *et al.*, 2014b). En 2005, Seifert *et al.* ont essayé d'établir

un protocole standardisé pour l'analyse des souches par ECP en utilisant l'enzyme *Apa*1. Dans cette étude, les auteurs ont montré que grâce à ce protocole, la reproductibilité intra-laboratoires était de l'ordre de 95%, tandis que celle inter-laboratoires était de l'ordre de 87% (Seifert *et al.*, 2005). Malgré ces essais, la reproductibilité inter-laboratoires reste toujours un défi. Parmi les autres inconvénients, on peut citer le travail intensif pour générer les résultats et le typage difficile de certaines souches (Rafei *et al.*, 2014b).

2. Single Locus Sequence Typing (S-LST)

Cette technique de typage est réalisée à partir du séquençage d'un gène bien spécifique, qui doit être assez discriminant d'un clone à l'autre au sein de l'espèce *A. baumannii*.

Le gène le plus utilisé comme outil de typage est le gène *bla*$_{\text{OXA-51-like}}$. Hamouda *et al.* ont montré une corrélation entre les résultats obtenus par séquençage de ce gène et ceux obtenus par la technique de référence utilisée pour l'étude des populations, la MLST (Multilocus Sequence Typing) (développé dans le paragraphe 4). En effet, ils ont montré qu'à chaque clone détecté par MLST correspondait un variant spécifique du gène OXA-51. Le séquençage de ce gène n'est toutefois pas assez discriminant pour l'étude des souches dans un contexte d'épidémie. Ainsi, l'étude de ce gène est réservée au screening des souches pour déterminer à quels clones internationaux elles appartiennent (Hamouda *et al.*, 2010).

Dans une autre étude, il a été montré que le séquençage du gène *bla*$_{\text{OXA-51-like}}$ permettait d'identifier correctement les séquence types (STs) de 585 souches multi-résistantes d'*A.baumannii* (Pournaras *et al.*, 2014). Par ailleurs, Zander *et al.* ont trouvé une corrélation entre les variants *bla*$_{\text{OXA-51-like}}$ et les huit clones internationaux identifiés par la technique de REP-PCR (DiversiLab) et ont mentionné qu'il était possible d'utiliser cette technique pour détecter ces clones (Zander *et al.*, 2012). Ainsi, étant facile, rapide et pas chère, cette technique est utile pour donner un aperçu global sur l'épidémiologie moléculaire d'*A.baumannii* (Rafei *et al.*, 2014b).

Le gène *ade*B fait partie d'un groupe de gènes décrits chez *A.baumannii*,codant pour un système d'efflux et appartenant à la famille RND (Resistance Nodulation Cell Division) qui est la pompe AdeABC (Coyne *et al.*, 2011). L'analyse du fragment interne (850 bp) de ce gène chez 50 souches multi-résistantes d'*A.baumannii* a montré la présence de 11 séquences types. La différentiation de ces souches par cette technique était corrélée avec d'autres techniques de

typage (Huys *et al.*, 2005). En outre, une bonne corrélation a été prouvée entre le séquençage de ce gène et le typage par MLST (Ansaldi *et al.*, 2011). Cependant, cette technique de typage ne peut pas être largement appliquée du fait de l'absence de ce gène chez certaines souches (Rafei *et al.*, 2014b).

Le séquençage du gène *rpo*B a été utilisé dans quelques travaux comme un outil de typage des *Acinetobacter*. Ainsi, Villalón *et al.* ont évalué le séquençage de la zone II du gène (figure 1) comme marqueur pour la détection rapide des souches épidémiques. Dans leur étude, 5 séquence types ont été détectés et leur distribution était corrélée avec les résultats obtenus avec l'électrophorèse en champ pulsé (Villalón *et al.*, 2011).

3. Trilocus Sequence Typing (3-LST)

3-LST est une autre approche qui a été proposée pour l'identification des clones et le typage des souches d'*A.baumannii*. Cette technique se base sur le séquençage de trois gènes ayant un polymorphisme important que sont les gènes l'*ompA* (codant pour la protéine de la membrane externe A), *csuE* (chaperon-subunit usher E, impliqué dans l'assemblage des pili) et $bla_{\text{OXA-51-like}}$. Ainsi, les isolats appartenant au même groupe doivent avoir la même recombinaison d'allèles pour ces trois loci et sont caractérisés par des séquences types.

L'application de cette technique a permis la caractérisation de plusieurs groupes ou « sequence groups » y compris SG 1-3 qui correspondent aux clones internationaux (Turton *et al.*, 2007). Etant donné que les équipements de séquençage ne sont pas disponibles dans tous les laboratoires, une PCR multiplexe a été développée pour l'identification rapide de ces groupes. Le 3-LST a été considéré comme une méthode utile pour le typage préliminaire et a montré des résultats concordants avec la MLST mais elle reste toujours moins discriminante que l'ECP (Rafei *et al.*, 2014b).

4. Multi-Locus SequenceTyping (MLST)

La MLST est l'une des techniques de typage les plus utilisées pour étudier la clonalité et la structure d'une population bactérienne. Elle évalue les variations génétiques neutres qui s'accumulent lentement au sein d'une population, en ciblant des gènes de ménage impliqués dans les processus métaboliques essentiels. La MLST se base sur le séquençage des fragments

internes de 7 gènes de ménage, chaque séquence correspondant à un allèle de ce gène. La combinaison de ces différents types d'allèles pour chaque gène peut définir un séquence type ou ST (Rafei *et al.*, 2014b). Le choix des gènes de ménage doit permettre de proposer une discrimination suffisante pour le typage bactérien, sans pour autant être influencé par la pression de sélection qui pourrait amener à des variations génétiques trop rapides.

Chez *A.baumannii*, deux schémas de MLST ont été développés. Le premier a été proposé par Bartual *et al.*, il se base sur l'analyse des séquences au niveau de régions conservées des gènes *glt*A codant pour la citrate synthase, *gyr*B pour la sous unité ß de l'ADN gyrase, *gdh*B pour la glucose déshydrogénase B, *rec*A pour le facteur de recombinaison homologue, *cpn*60 pour le chaperonine (60kDa), *gpi* pour la glucose-6-phosphate isomérase et *rpo*D pour le facteur sigma de l'ARN polymérase (Bartual *et al.*, 2005). Ce protocole a été assigné comme MLST d'"Oxford", et les profils d'*A.baumannii* typés sont proposés sur la base de données Oxford (http://pubmlst.org/abaumannii). Cependant, plusieurs études ont montré l'inutilité de certains loci dans ce schéma. Par exemple, il a été montré que les gènes *gyr*B et *gpi* n'étaient pas de bons candidats car ils pouvaient être influencés par des transferts horizontaux (Hamouda *et al.*, 2010).

Le second schéma, assigné comme MLST "Pasteur" et proposé par Diancourt *et al.*, se base sur l'analyse des séquences des gènes *cpn*60 (chaperonin 60 kDa), *fus*A (facteur d'élongation EF-G, *glt*A (citrate synthase), *pyr*G (CTP synthase), *rec*A (facteur de recombinaison homologue), *rpl*B (proteine ribosomale 50S L2) et *rpo*B (sous unité ß de l'ARN polymérase) (Diancourt *et al.*, 2010). Les profils générés par cette technique sont présents dans la base de données Pasteur (http://pubmlst.org/abaumannii).

Malgré le fait que ces deux schémas ne soient pas toujours concordants (Tomaschek *et al.*, 2016), la MLST est une technique très discriminante pour *A.baumannii*, largement utilisée pour investiguer la structure des populations circulant dans différents pays. Elle permet d'avoir une idée sur l'épidémiologie globale de cette bactérie et ainsi de définir des lignées mondiales ou complexes clonaux (CC). Un CC est défini comme l'ensemble des ST possédant 5 ou 6 allèles communs (Rafei *et al.*, 2014b). En outre, cette technique génère des données standardisées, reproductibles et facilement comparables entre les laboratoires. Cependant, elle

est une approche coûteuse qui n'est pas appropriée pour les études épidémiologiques fines visant à distinguer des souches étroitement apparentées (Rafei *et al.*, 2014b).

5. AFLP

Cette technique, déjà évoquée et décrite pour l'identification d'*A.baumannii,* peut également être utilisée pour le typage bactérien (Peleg *et al.*, 2008). De même que l'ECP, l'AFLP est considérée comme une méthode robuste pour le typage d'*A.baumannii*, et les profils obtenus peuvent être comparés à des bases de données (Dijkshoorn *et al.*, 2007). En général, un seuil de 80% de similarité est utilisé pour la définition de clones, tandis que pour la comparaison de souches dans un contexte d'épidémie locale, un seuil de 90% est proposé (van den Broek *et al.*, 2009; Rafei *et al.*, 2014b). Ainsi, grâce à son pouvoir discriminant, cette technique est capable d'identifier les clones émergents tels que les clones européens, mais également les nouveaux clones (Rafei *et al.*, 2014b). Une bonne corrélation avec L'ECP et le ribotypage a été rapportée (van Dessel *et al.*, 2004; Nemec *et al.*, 2004; Rafei *et al.*, 2014b), mais la capacité de résolution de l'AFLP reste supérieure à celle de ribotypage, en lien avec le fait que cette dernière détecte les variations au sein des gènes codant pour les ADNr, alors que l'AFLP détecte les variations sur le génome entier. En outre, une bonne corrélation est observée avec la MLST pour l'identification des clones, tandis que pour la comparaison des souches l'AFLP est plus discriminante (Diancourt *et al.*, 2010). Cependant, le coût, le temps de travail et le manque de reproductibilité inter-laboratoires restent souvent des inconvénients (Rafei *et al.*, 2014b).

6. Ribotypage

Outre son application dans l'identification, le ribotypage semble également un outil important et reproductible pour étudier l'épidémiologie moléculaire et la diversité des *Acinetobacter*. Ainsi, les ribotypes résultant de l'enzyme *Hind*III en association avec les résultats de l'AFLP a permis l'identification des clones épidémiques circulant en Europe (Nemec *et al.*, 2004). Les résultats de cette technique ont l'avantage de pouvoir être facilement comparés entre laboratoires. Cependant, le pouvoir discriminant faible rend cette technique plus adaptée pour étudier les structures des populations plutôt que l'épidémiologie locale. En outre, elle est plus laborieuse et a une capacité de résolution moins élevée que d'autres techniques de typage comme l'ECP (Rafei *et al.*, 2014b).

7. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

Le RAPD est l'une des techniques de génotypage les plus faciles à utiliser. Elle est basée sur une amplification aléatoire des fragments d'ADN en utilisant des amorces courtes et non spécifiques utilisées dans des conditions de faible stringence. Ainsi, le nombre et la position des sites cibles de ces amorces peuvent varier sur le génome et par conséquent le nombre et la taille des fragments amplifiés également (Ahmed and Alp, 2015; Rafei *et al.*, 2014b). Plusieurs types de protocoles et d'amorces ont été utilisés pour le typage d'*A.baumannii*. Les amorces choisies possèdent généralement une courte séquence, de l'ordre de 10 nucléotides, et sont utilisées à des températures d'hybridation faibles (Ahmed and Alp, 2015; Minandri *et al.*, 2012). Dans une étude réalisée sur des souches d'*A.baumannii* isolées dans plusieurs pays européens, il a été montré que les résultats du typage par RAPD étaient concordants avec ceux de l'ECP et du MLST, indiquant que cette technique était capable de fournir des informations pour la surveillance des épidémies (Wisplinghoff *et al.*, 2008).

Cependant à une grande échelle, cette technique souffre d'un manque de reproductibilité, ce qui limite son utilisation. Ceci est dû à l'absence de réactifs et d'équipements standardisés, à des différences entre les laboratoires dans les protocoles et les conditions de PCR et par conséquent l'échange des données est impossible. Pour cela, le RAPD ne semble pas adapté pour la comparaison de profils obtenus sur des souches de localisations différentes, et réalisés à des temps et sur des gels différents (van Belkum *et al.*, 2007; Rafei *et al.*, 2014b).

8. Repetitive Extragenic Palindromic (REP) PCR

C'est une technique de PCR qui étudie la dispersion des séquences répétées au niveau du génome bactérien. Cette technique examine les régions séparant les séquences répétées en utilisant des amorces spécifiques qui permettent d'amplifier des fragments d'ADN de différentes taille après migration sur un gel d'électrophorèse (Rafei *et al.*, 2014b). La rapidité, la flexibilité et l'accessibilité font de cette technique un outil moléculaire important pour étudier et détecter des souches épidémiques. Cependant, l'un des principaux inconvénients de cette technique c'est l'utilisation d'un gel d'agarose traditionnel ce qui aboutit à un manque de reproductibilité intra et inter laboratoires et ainsi à des données non échangeables (Ahmed and Alp, 2015; Rafei *et al.*, 2014b).

Récemment, la REP-PCR est devenue semi automatisée et commercialisée sous le nom de DiversiLab™ (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Des kits développés pour diverses espèces bactériennes y compris *A.baumannii* sont disponibles sur le marché. Dans ce système, l'amplification des régions correspondantes est suivie d'une migration par électrophorèse capillaire. Ce processus automatisé a permis d'augmenter la résolution et la reproductibilité et a permis de générer des données épidémiologiques qui peuvent être automatiquement collectées et analysées par un logiciel adapté (Ahmed and Alp, 2015). Le DiversiLab™ a été utilisé dans plusieurs études épidémiologiques et a permis de décrire plusieurs clones internationaux (WW1, WW2, WW3, WW4, … WW8) (Higgins *et al.*, 2010b).

Il a été rapporté que cette approche possédait une discrimination similaire à celle de l'ECP (Bou *et al.*, 2000a; Martín-Lozano *et al.*, 2002) et supérieure à celle de ribotypage (Carretto *et al.*, 2008). D'autre part, de bonnes corrélations avec la MLST ont été observées (Higgins *et al.*, 2012). Pour ces raisons, il a été considéré comme un outil moléculaire pouvant être utilisé en première intention pour les études de surveillance locales et nationales (Rafei *et al.*, 2014b). Toutefois, ce système est coûteux (Ahmed and Alp, 2015).

9. Multiple Locus Variable Number of Tandem Repeat Analysis (MLVA)

Le MLVA est une méthode de PCR qui exploite le nombre de répétitions d'une séquence d'ADN sur plusieurs loci connue sous le nom de VNTR ou Variable Number of Tandem Repeat (Lindstedt, 2005). Il a été considéré comme un bon outil pour le typage des *Acinetobacter*. En effet, le MLVA a montré une concordance avec d'autres techniques et parfois une capacité de discrimination plus importante que celle de l'ECP par exemple (Hu *et al.*, 2013; Pourcel *et al.*, 2011; Villalón *et al.*, 2015). Cependant, l'évolution rapide et donc les mutations qui caractérisent certains *loci* limitent parfois l'utilisation de cette technique (Pourcel *et al.*, 2011). Globalement, cette approche est efficace et reproductible mais la robustesse dépend également du choix des loci étudiés, selon que ces derniers sont soumis ou non à un polymorphisme important. Ainsi, la combinaison de *loci* d'évolution rapide avec d'autres d'évolution plus lente permet de réaliser des études à large échelle et d'investiguer des épidémies locales (Rafei *et al.*, 2014b).

10. Multilocus PCR/Electrospray Ionization Mass Spectrometry (PCR-ESI-MS)

La PCR-ESI-MS est considérée comme une variante de la MLST. Dans cette technique, les régions conservées de 6 gènes de ménage (*trp*E, *adk*, *efp*, *mut*Y, *fum*C et *ppa*) d'*A.baumannii* sont amplifiés et le spectre de masse des produits amplifiés est déterminé. L'utilité de ce système résulte dans la rapidité (résultats en 6-8 h) et la capacité à examiner un grand nombre d'échantillons (Rafei *et al.,* 2014b). Cette approche, disponible sous forme d'une plateforme automatisée (Ecker *et al.,* 2006; Wolk *et al.,* 2012), a été utilisée dans plusieurs études portant sur l'épidémiologie d'*A.baumannii* (Decker *et al.,* 2012; Ecker *et al.,* 2006; Perez *et al.,* 2010; Schuetz *et al.,* 2012). Une bonne corrélation a été observée avec l'ECP (Ecker *et al.,* 2006; Perez *et al.,* 2010), et une capacité de discrimination supérieure à celle de la REP-PCR a été notée (Perez *et al.,* 2010; Schuetz *et al.,* 2012). Aussi, la PCR-ESI-MS apparait comme un outil puissant pour le typage d'*A.baumannii*, permettant des investigations d'épidémies locales ainsi que des études de populations bactériennes à plus large échelle.

11. Typage par la Spectrométrie de Masse (MALDI-TOF MS)

Avec l'arrivée du MALDI-TOF MS au sein des laboratoires et son utilisation pour l'identification des espèces bactériennes y compris les *Acinetobacter* (Pailhoriès *et al.*, 2015a), plusieurs études ont rapporté l'utilisation de ce système comme un outil facile et rapide pour le typage bactérien et la détection des épidémies. En 2013, Mencacci *et al.* ont évalué cette technique pour le typage des *Acinetobacter* dans un contexte d'épidémies nosocomiales en comparaison avec l'approche DiversiLab. Dans cette étude, 35 souches d'*A.baumannii* issues de patients hospitalisés ont été analysées par MALDI-TOF MS, et en utilisant des procédés logarithmiques particuliers, un dendrogramme a été élaboré. Ainsi, 3 clusters de souches ont été obtenus générant des résultats concordants avec ceux obtenus avec le DiversiLab (Mencacci *et al.*, 2013).

Dans une autre étude, Sousa *et al.* ont évalué la performance de cette technique avec le typage de 58 souches d'*A.baumannii* isolées dans des hôpitaux portugais de localisations géographiques différentes par comparaison avec d'autres méthodes de typage. Les auteurs ont montré que la similarité des spectres de masse entre des souches appartenant à des clones différents a empêché la discrimination des STs différents même après l'utilisation de plusieurs outils d'analyse (Sousa *et al.*, 2015). Récemment, Wang *et al.* ont proposé une nouvelle

approche peptidomique pour le typage des *Acinetobacter* en utilisant la spectrométrie de masse. Cette technique se base sur l'analyse des profils des peptides spécifiques qui pourraient être un marqueur pour distinguer et classifier les souches. Ainsi, des résultats concordants avec la MLST ont été rapportés (Wang *et al.*, 2016).

Finalement, la MADI-TOF MS semble une technique rapide et prometteuse pour le typage d'*A.baumannii*. Cependant, il se peut que les spectres de masse, fondés sur l'analyse des protéines, principalement ribosomales, soient soumis à une variabilité insuffisante pour distinguer les différents clones. Pour cela, d'autres études sont nécessaires pour la validation de ce système.

12. Typage par Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR typing)

Les CRISPR sont des séquences d'ADN très polymorphiques trouvées dans le génome de nombreuses espèces bactériennes. Ces éléments, avec les gènes voisins appelés *cas* pour 'CRISPR associated', permettent d'avoir un système d'immunité acquise contre les bactériophages et les plasmides. Généralement, chaque locus CRISPR cas est composé d'un groupe spécifique d'espaceurs qui évoluent au cours du temps. Chez *A.baumannii*, 2 systèmes de CRISPR cas ont été identifiés.

Le CRISPR typing est une approche qui permet d'étudier la diversité des espaceurs au niveau de ces systèmes en utilisant des amorces spécifiques pour l'amplification et le séquençage. En utilisant une collection des souches provenant de différents pays, Karah *et al.* ont montré la présence de 40 CST ou CRISPR séquence type qui peuvent être comparés au complexes clonaux obtenus par MLST. Malgré un nombre d'études encore limité, il est possible d'utiliser cette technique pour l'étude de populations d'*A.baumannii* (Karah *et al.*, 2015).

13. Séquençage du génome complet

L'introduction des nouvelles technologies de séquençage à haut débit sur le marché a permis de réaliser des études génomiques afin d'avoir les séquences complètes ou partielles (draft) du génome de centaines de souches d'*A.baumannii*, y compris celles appartenant aux clones internationaux. Contrairement aux techniques de typage traditionnelles, le séquençage du génome entier ou « Whole Genome Sequencing » (WGS) permet d'analyser toutes les informations génétiques présentes dans le génome des bactéries. Par conséquent, cette approche peut détecter des différences génétiques mineures entre les souches apparentées et peut élucider les voies de transmission entre les patients (Lewis *et al.*, 2010; Rafei *et al.*, 2014b).

Le pouvoir discriminant de WGS est plus important que toutes les autres techniques de typage (Fitzpatrick *et al.*, 2016). Dans une étude récente, Fitzpatrick *et al.* ont étudié l'intérêt de WGS pour le typage d'*A.baumannii*. Les auteurs ont proposé une approche pour la détermination des lignées clonales. Ainsi, un seuil de 2500 SNPs dans le core génome a été proposé pour identifier des souches appartenant à un même clone.

Les études des génomes peuvent également fournir des informations permettant la compréhension de la dynamique des épidémies en milieu hospitalier : l'évolution de l'agent pathogène au sein de l'hôpital voir chez le même patient ; l'origine, l'histoire et les voies de transmission d'une épidémie ; les transferts horizontaux, les recombinaisons et les mutations qui dirigent l'évolution ; les déterminants génétiques de résistance qui circulent au cours d'une épidémie. En conclusion, le WGS est une technique prometteuse et peut devenir la méthode de référence pour le typage des souches et la surveillance des épidémies. Cependant, elle reste une approche coûteuse et pour laquelle l'analyse des séquences est complexe. Ainsi, pour le moment, elle ne semble pas adaptée à une utilisation dans des laboratoires de routine (Rafei *et al.*, 2014b).

Tableau 2: Tableau récapitulant les principales techniques utilisées pour le typage d'*A.baumannii*

Technique de typage	Structure génétique ciblée	Etapes principales	Avantages	Inconvénients	Application
Séquençage d'un seul gène / Single locus sequence typing (SLST)	Polymorphisme des gènes (*ade*B, *rpo*B, *rec*A, $bla_{\text{OXA-51-like}}$)	*ade*B : analyse des séquences : *ade*B (850 pb), *rpo*B : (350 ou 450 pb), *rec*A (336 pb), $bla_{\text{OXA-51-like}}$	Rapide, facile	Pouvoir discriminant limité, doit être couplé à d'autres méthodes	Utile pour le typage préliminaire surtout le $bla_{\text{OXA-51-like}}$ (attribution des isolats aux clones internationales)
Séquençage de trois gènes / three locus sequence typing (3LST)	Polymorphisme de 3 gènes (*omp*A, *csu*E, $bla_{\text{OXA-51-like}}$)	Analyse des séquences : *omp*A (686 pb), *csu*E (449 pb), $bla_{OXA\text{-}51\text{-}like}$ (693 pb) ou une PCR multiplexe	Rapide, facile, disponibilité d'une base de données électronique	Pouvoir discriminant limité	Etude des populations
MLST schéma de Bartual	Polymorphisme dans les séquences de 7 gènes de ménage	Analyse des séquences internes de 7 gènes suivants (*gltA*, *gyrB*, *gdhB*, *recA*, *cpn60*, *gpi*, *rpoD*)	Portable, reproductible, bon pouvoir discriminant pour identifier les clones, disponibilité d'une base de données électronique	Laborieuse, coûteuse, difficulté de différencier entre souches étroitement liées	Méthode de choix (gold standard) pour les études d'épidémiologie globale et les structures des populations
MLST schéma de Pasteur	Polymorphisme dans les séquences de 7 gènes de ménage	Analyse des séquences internes de 7 gènes suivants (*cpn60*, *fusA*, *gltA*, *pyrG*, *recA*, *rplB*, *rpoB*)	Portable, reproductible, bon pouvoir discriminant pour identifier les clones, disponibilité d'une base de données électronique	Laborieuse, coûteuse, difficulté de différencier entre souches étroitement liées	Méthode de choix (gold standard) pour les études d'épidémiologie globale et les structures des populations
ECP/ PFGE	Genome complet	Coupure de l'ADN par des enzymes de restriction (ex : ApaI) suivie d'une migration sur un gel d'électrophorèse en champs pulsé	Pouvoir discriminant très important	Laborieuse, difficulté de typer certaines souches, manqué de reproductibilité inter-laboratoires	Méthode de référence (gold standard) pour les études d'épidémies locales dans un intervalle de temps bien déterminé
AFLP	Génome complet	Restriction de l'ADN avec deux enzymes (*Mse*I et *Eco*RI) suivie d'une ligation d'adaptateurs, d'une amplification sélective, et d'une migration sur gel d'électrophorèse	Bonne résolution (espèces, clones souches), pouvoir discriminant très élevé,	Laborieuse, coûteuse, manque de reproductibilité inter-laboratoires	Outil important pour les études taxonomiques, et les études d'épidémiologie moléculaires locales et à grande échelle

Technique de typage	Structure génétique ciblée	Etapes principales	Avantages	Inconvénients	Application
Ribotypage	ADN ribosomal	Restriction enzymatique suivie d'une Southern blot et hybridation des sondes	Reproductible	Pouvoir discriminant limité	Identification du complexe Acb, études des populations
RAPD	Génome complet	PCR avec des amorces arbitraires suivie d'une migration sur gel d'électrophorèse	Rapide, facile, pouvoir discriminant acceptable	Manque de reproductibilité	Outil de screening à une echelle locale
REP-PCR	Régions séparant les séquences répétées au niveau du génome	PCR avec des amorces externes complémentaires aux séquences répétées suivie d'un gel d'électrophorèse	Rapide, facile, reproductible (DiversiLab) pouvoir discriminant élevé,	Manque de reproductibilité en cas de système manuel, cout élevé	Etudes épidémiologiques locales et à grande échelle
MLVA	Nombre de répétitions d'une séquence d'ADN sur plusieurs loci (VNTR)	Amplification de VNTR suivie d'un gel d'électrophorèse	Portable, reproductible, pouvoir discriminant élevé, disponibilité d'une base de données électronique	Evolution rapide de certains loci	Typage des souches étroitement apparentées, étudesépidémiologiques à large échelle, étude des populations
PCR-ESI/MS	Polymorphisme au niveau de 6 gènes de ménage	Amplification de plusieurs locus suivie d'une obtention des spectres par ESI-MS	Rapide, portable, automatisée (plexID™; Abbott Molecular, IL, USA)	Coûteuse, n'est pas disponible dans les laboratoires cliniques	Identification des espèces, genotypage et études des populations
MALDI-TOF MS	Protéines ribosomales	Acquisition des spectres de masse et construction d'un dendrogramme	Rapide, facile	Pouvoir discriminant discutable	Identification et typage
CRISPR typing	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats	Amplification et séquençage de système CRISPR (Attribution d'un CST)	Rapide, facile	Pouvoir discriminant discutable	Identification des sub clones, complémentaire au MLST
WGS	Polymorphisme au niveau du génome complet	Séquençage complet du génome suivi de génomique comparative	Rapide, techniques automatisées	Coûteuse, accès difficile à cette technique dans les laboratoires de routine, analyse difficile des séquences (nécessité des outils bioinformatiques parfois compliqué)	Analyse de toutes les informations génétiques présentes dans le génome, études épidémiologiques fines, locales et à grande échelle

VII. Epidémiologie extrahospitalière

1. *A.baumannii*

Alors qu'en milieu hospitalier, la présence d'*A.baumannii* doit être considérée comme une contamination à partir d'un patient colonisé ou infecté, le réservoir extrahospitalier de cette bactérie reste encore peu connu, et même si des études s'intéressent à son écologie en dehors d'un contexte infectieux, les données de la littérature restent à ce jour encore peu fournies (Eveillard *et al.*, 2013).

1.1. Environnement

A.baumannii a été isolé de divers environnements. Ainsi, il a été décrit dans des sols contaminés par des hydrocarbures pétroliers au Kuwait, en Inde ou encore en France (Bordenave *et al.*, 2007; Obuekwe *et al.*, 2009; Sarma *et al.*, 2004). En effet, certaines souches sont capables de dégrader les hydrocarbures ainsi que d'autres composants y compris les polluants organiques. Dans une étude réalisée à Hong Kong sur 66 échantillons de sols, il a été rapporté que plus d'un tiers étaient positifs pour *Acinetobacter* spp dont 23% d'*A.baumannii* (Berlau *et al.*, 1999a). En outre, l'espèce a été isolée dans des études réalisées au Royaume Uni et en Asie du Sud-Est, à partir d'échantillons de sols dans des zones d'agriculture ou à proximité de fermes (Byrne-Bailey *et al.*, 2009; Huys *et al.*, 2007). Dans une étude récente, Rafei *et al.* ont montré la présence d'*A.baumannii* dans environ 7% des échantillons d'eau de source et de puits collectées au Liban (Rafei *et al.*, 2015a). Enfin, une étude conduite en Corée du Sud a rapporté la présence de cette bactérie sur des surfaces inertes régulièrement en contact avec les hommes, telles que les tables dans les parcs ou encore les consoles de jeux vidéo (Choi *et al.*, 2012).

1.2. Produits alimentaires

A.baumannii a été détecté, mais que très rarement, dans certains produits alimentaires. Ainsi, plusieurs études ont montré sa présence sur des légumes achetés en supermarché, dans des commerces de proximité ou prélevés de jardins particuliers (Berlau *et al.*, 1999a; Houang *et al.*, 2001). *A.baumannii* a également été isolé de poissons, de viande ou encore de lait ou de fromage (Gurung *et al.*, 2013; Houang *et al.*, 2001). Au Liban, cette bactérie a été isolée dans 3%, et des échantillons de lait, 8% de viande et 14% des échantillons de fromage (Rafei *et al.*, 2015a).

1.3. Portage chez l'homme

Les données concernant le portage d'*A.baumannii* chez l'homme sont limitées. En 2003, une étude effectuée à New York a montré que 10.4% des résidents de la communauté portaient *A.baumannii* sur leurs mains (Zeana *et al.*, 2003). Dans une autre étude réalisée sur des soldats de l'armée, il a été rapporté que 17% étaient colonisés par le complexe *A.calcoaceticus-A.baumannii*. En outre, plusieurs autres études réalisées en Asie et en Europe ont montré la présence de cette bactérie sur la peau des patients et des individus sains (Berlau *et al.*, 1999b; Chu *et al.*, 1999; Seifert *et al.*, 1997). D'autre part, *A.baumannii* a été isolée des selles de 0.9 % des individus sains prélevés au Royaume-Uni et aux Pays-Bas (Dijkshoorn *et al.*, 2005) et de 5.4% des individus prélevés en Sénégal (Kempf *et al.*, 2012a). Récemment, Hammami *et al.* ont investigué le portage rectal des bactéries Gram négatif chez des patients admis à une unité de soins intensifs en Tunisie. Les auteurs ont ainsi rapporté l'isolement des souches multi-résistantes y compris *A.baumannii* et certaines entérobactéries (Hammami *et al.*, 2017).

1.4. Les animaux

A.baumannii a aussi été détecté chez les animaux. La plupart des études ont été effectuées dans des cliniques vétérinaires. Les infections ont été plutôt rapportées chez les chevaux et les animaux de compagnie avec une légère prédominance dans les prélèvements des plaies et des abcès (Endimiani *et al.*, 2011; Eveillard *et al.*, 2013).

Dans une étude réalisée en Ecosse, des prélèvements de selles ainsi que des écouvillons de peau, narines et oreilles ont été effectués chez des porcs et des bœufs provenant de différentes fermes et conduits à l'abattoir afin de rechercher une colonisation par *A.baumannii*. Le pourcentage de portage était de 1,2% et les souches isolées étaient groupées en 3 clusters différents mais leur profil electrophorétique en champ pulsé était différent de ceux des trois clones humains majeurs qui circulent en Europe, ECI, ECII, et ECIII (Hamouda *et al.*, 2011).

Des souches multi-résistantes ont été isolées chez les animaux. Ainsi, Zordan *et al.* ont rapporté des souches résistantes d'*A.baumannii* isolées dans des cliniques vétérinaires en Allemagne, la plupart appartenant aux clones internationaux (Zordan *et al.*, 2011). Sur l'Ile de la Réunion, *A.baumannii* a été aussi détecté chez plusieurs types d'animaux présents en clinques vétérinaires (Belmonte *et al.*, 2014; Pailhoriès *et al.*, 2015b). Ceci indique que comme en

médecine humaine, *A.baumannii* est un pathogène opportuniste qui peut émerger en médecine vétérinaire. Cependant, aucune étude n'a montré que le contact entre les hommes et les animaux augmentaient le risque d'infection. Au Liban, des études récentes ont rapporté la présence d'*A.baumannii* chez les animaux d'élevage, les animaux de compagnie, les chevaux ainsi que chez d'autres animaux (Bayssari *et al.,* 2015; Rafei *et al.,* 2015a).

Outre les animaux vertébrés, *A.baumannii* a été isolé pour la première fois dans des poux de corps prélevés dans le cadre d'une étude menée sur des personnes sans domicile fixe à Marseille. Cette bactérie a aussi été détectée dans les poux de corps dans d'autres pays en Europe, Afrique, et en Amérique du Sud (Kempf *et al.,* 2012a, 2012b; La Scola and Raoult, 2004). Bouvresse *et al.* ont rapporté en France, la présence d'*A.baumannii* dans 33% des poux de têtes chez des enfants scolarisés dans des écoles primaires (Bouvresse *et al.,* 2011).

Enfin, cette bactérie a également été détectée dans le tube digestif de certains arthropodes. Ainsi, au Brésil, Gouveia *et al.* ont mis en évidence des souches d'*A.baumannii* chez la mouche *Lutzomyia longipalpis*, agent qui transmet le parasite *Leishmania infantum chagazi* en Amérique (Gouveia *et al.*, 2008).

2. Réservoirs extrahospitaliers des *Acinetobacter* non *baumannii*

L'introduction des techniques moléculaires dans les laboratoires de recherche a beaucoup amélioré l'identification des espèces appartenant au genre *Acinetobacter*. Ainsi, plusieurs études épidémiologiques et métagénomiques ont été réalisées et ont montré la présence des *Acinetobacter* non *baumannii* dans diverses niches écologiques. Les différents réservoirs extrahospitaliers de ces *Acinetobacter* ainsi que les méthodes moléculaires et biochimiques utilisées pour l'identification ont été décrits dans une revue qui a été publiée dans le journal « Future Microbiology » (page 73 dans le manuscrit).

3. Liens possibles entre les réservoirs extrahospitaliers et les infections

Dans une étude réalisée à Singapour, il a été montré qu'*A.baumannii* colonisait les brûlures des patients très tôt au cours de leur séjour dans les hôpitaux (médiane de 2 jours) (Chim *et al.*, 2007). Ceci montre que l'importation des souches de la communauté par l'intermédiaire des patients est une possibilité à ne pas négliger. En Afghanistan et en Iraq, plusieurs scenarios ont été proposés pour déterminer l'origine des infections chez les soldats blessés. Il a été suggéré une acquisition à partir de sources environnementales dans les zones de guerre, ou durant l'évacuation vers les hôpitaux militaires, à l'intérieur de ces hôpitaux ou encore après l'évacuation en dehors des zones de conflits (Eveillard *et al.*, 2013). Plusieurs autres études ont également rapporté des taux élevés d'infection ou de colonisation par des souches d'*Acinetobacter* dans lez zones de guerre chez des patients, avant ou pendant leur admission dans les hôpitaux (Ake *et al.*, 2011; Scott *et al.*, 2007; Yun *et al.*, 2006). Cependant, d'autres observations ont suggéré que l'environnement n'était pas une source d'infection (Petersen *et al.*, 2011).

Une colonisation préalable par *A.baumannii* pourrait jouer un rôle dans le développement des infections communautaires. Ceci est supporté par le fait qu'il existe une différence dans les taux de portage de cette bactérie identifiée chez les patients non hospitalisés. Ainsi, un taux de colonisation de 4% est rapporté à Hong Kong pendant les saisons chaudes et humides tandis qu'en Europe le taux de colonisation cutanée ou fécale reste inférieure à 1%, ce qui peut expliquer la rareté ou l'absence des infections communautaires en Europe (Chu *et al.*, 1999; Eveillard *et al.*, 2013).

Finalement, la présence chez les animaux des souches d'*A.baumannii* appartenant aux clones internationaux peut refléter une transmission probable des hommes aux animaux ou vice versa (Hamouda *et al.*, 2011).

VIII. Facteurs de virulence d'*A.baumannii*

Le séquençage complet des génomes de plusieurs souches d'*A.baumannii*, le développement des outils de manipulation des génomes pour créer des mutants ainsi que l'utilisation des modèles animaux ont joué un rôle crucial dans l'identification et la compréhension des facteurs contribuant à la pathogenèse de cette espèce. Ci-dessous sont développés les principaux facteurs de virulence décrits chez *A.baumannii* (tableau 3).

1. La protéine de la membrane externe OmpA

L'un des facteurs de virulence les plus caractérisés chez *A.baumannii* est la protéine de membrane externe OmpA, qui est la protéine de surface la plus abondante. OmpA est impliquée dans l'adhérence et l'invasion des cellules épithéliales et contribue à la dissémination d'*A.baumannii*. Dans un modèle animal de pneumonie, il a été rapporté que le taux d'*A.baumannii* dans le sang était significativement plus élevé chez les souris infectées avec les souches sauvages en comparaison avec celui détecté chez les souris infectées avec les souches mutées pour le gène codant OmpA (Choi *et al.,* 2008). En outre, cette protéine permet aux bactéries de persister et se développer dans le sérum humain en évitant les voies du complément (Kim *et al.,* 2009) et facilite la formation des biofilms (Gaddy *et al.,* 2009).

Choi *et al.* ont montré par mutagenèse aléatoire à l'aide de transposons, que les souches mutées pour le gène *omp*A induisaient moins l'apoptose des cellules épithéliales du larynx humain (Choi *et al.,* 2005).

2. Le Lipopolysaccharide

Le lipopolysaccharide (LPS), composant majeur de la membrane externe des bactéries Gram négatif joue un rôle potentiel dans la pathogenèse chez *A.baumannii*. En effet, il a été montré que des mutants de LPS, présentaient une atténuation de la résistance au sérum humain ainsi qu'une diminution de survie dans un modèle d'infection des tissus mous chez les rats (Luke *et al.,* 2010). En outre, d'autres études ciblant les gènes codant pour le noyau oligosaccharide ont montré que ce composé contribuait à la survie et la virulence d'*A.baumannii* (Lin *et al.,* 2012; McQueary *et al.,* 2012). Il a également été rapporté que des modifications au niveau du lipide A favorisaient la résistance aux peptides antimicrobiens et la survie dans des conditions de dessiccation (Boll *et al.,* 2015).

3. La capsule

La capsule est considérée comme un facteur de virulence car elle peut jouer un rôle important dans la protection des bactéries à la réponse immunitaire innée de l'hôte (Weber *et al.*, 2016). Russo *et al.* ont montré que les mutants dépourvus de capsule présentaient une croissance réduite dans le sérum humain et dans le liquide d'ascite. De plus, les souches mutantes sont totalement éliminées après 24 h dans un modèle d'infection des tissus mous chez le rat, alors que les souches sauvages persistent dans le fluide exsudatif (Russo *et al.*, 2010). Dans une étude récente, il a été montré dans un modèle d'infection systémique chez la souris, que la présence des concentrations élevées d'antibiotiques favorisait la production de la capsule chez *A.baumannii,* permettant à cette bactérie d'échapper aux facteurs sériques du complément (Geisinger and Isberg, 2015).

4. Les phospholipases

Les phospholipases bactériennes sont des enzymes lipolytiques assurant le clivage des phospholipides. Ces enzymes contribuent à la pathogenèse des bactéries Gram négatif en catalysant le clivage des phospholipides présents dans la membrane cellulaire et dans les barrières muqueuses afin de faciliter la lyse cellulaire et l'invasion bactérienne (McConnell *et al.*, 2013). Chez *A.baumannii*, l'inactivation des phospholipases D induit une réduction de sa capacité à survivre dans le sérum et à envahir des cellules épithéliales (Jacobs *et al.*, 2010). En outre, dans un modèle animal de pneumonie, il a été montré que les souris infectées avec une souche sauvage avaient une charge bactérienne plus élevée dans le cœur et le foie 48h après l'infection en comparaison avec des souris infectées avec une souches mutante, indiquant que la phospholipase facilite la dissémination d'*A.baumannii* (McConnell *et al.*, 2013).

5. Les systèmes de sécrétion

Les systèmes de sécrétion des protéines chez les bactéries à Gram négatif sont extrêmement diversifiés du point de vue fonction et composition et sont considérés comme des médiateurs importants de virulence. Des recherches récentes ont pu élucider plusieurs mécanismes par lesquels les *Acinetobacter* pouvaient secréter les protéines ainsi que leurs rôles dans la pathogenèse de ces bactéries (Weber *et al.*, 2016). Les vésicules de membrane externe (Outer Membrane Vesicule, OMV) sont des nanovésicules sphériques identifiées chez les bactéries Gram négatif. Elles sont composées de LPS, de protéines de membrane externe, de

protéines périplasmiques, protéines cytoplasmiques, lipides, d'ADN et d'ARN (McConnell *et al.*, 2013). Les OMVs contribuent à la pathogenèse en transportant des facteurs de virulence à l'intérieur des cellules hôtes, en facilitant le transfert horizontal des gènes et en protégeant la bactérie contre la réponse immunitaire de l'hôte (Ellis and Kuehn, 2010). *A.baumannii* secrète des OMVs lors des infections. Les OMVs sont aussi capables de transférer des gènes de résistance, comme cela a été montré pour le gène $bla_{\text{OXA-24-like}}$, suggérant par conséquent un rôle de ces vésicules dans la diffusion de la résistance aux antibiotiques (Rumbo *et al.*, 2011).

L'Ata ou *Acinetobacter* trimeric autotransporter est une autre protéine qui facilite l'adhérence d'*A.baumannii* à certains composants de la matrice extracellulaire tel que le collagène et est impliqué dans la formation des biofilms. Ainsi, la mutation de ce gène attenue la capacité à former les biofilms et rend la souche moins virulente dans les modèles animaux (Bentancor *et al.*, 2012).

6. L'acquisition de fer

Le fer est un élément important pour les bactéries mais n'est pas facilement disponible chez l'hôte, car il se trouve complexé avec l'hème, la lactoferrine et la transferrine. Les bactéries ont développé plusieurs stratégies pour l'acquisition du fer (Roca *et al.*, 2012). *A.baumannii* acquiert le fer en exprimant des systèmes de capture et d'utilisation de l'hème (Antunes *et al.*, 2011; Zimbler *et al.*, 2009). En outre, il est capable d'acquérir le fer *via* les sidérophores. Plusieurs systèmes de sidérophores ont été décrits : sidérophore souche 8399, l'Acinetobactine, Fimsbactins A-F, sidérophore ACICU 1672-1683 et sidérophore ABAYE1888-1889 (McConnell *et al.*, 2013; Mortensen and Skaar, 2013). Parmi eux, l'Acinetobactine est le sidérophore le plus caractérisé (Gaddy *et al.*, 2012).

7. Formation de biofilm

A.baumannii a une capacité remarquable à survivre et prospérer en milieu hospitalier en raison de ses interactions avec différents types de surface y compris les surfaces abiotiques telles que les meubles, les drapes et les équipements médicaux (cathéters, équipements respiratoires) (Peleg *et al.*, 2008). Un tel comportement est concordant avec sa capacité à survivre de longues périodes sur ces surfaces sèches. En outre, cette bactérie est capable de coloniser les surfaces biotiques telles que les cellules épithéliales humaines (McConnell *et al.*,

2013; Roca *et al.*, 2012). L'adhérence d'*A.baumannii* aux surfaces biotiques et abiotiques aboutit à la formation des biofilms. Ces derniers sont définis comme des communautés bactériennes associées à une surface et enfermées dans une matrice extracellulaire contenant des carbohydrates, des acides nucléiques, des protéines et autres macromolécules, au sein desquelles les bactéries deviennent plus résistantes aux antibiotiques que leurs similaires planctoniques (Gaddy and Actis, 2009). Par conséquent, la formation de ces biofilms est un facteur de virulence qui contribue à la pathogénicité d'*A.baumannii* (McConnell *et al.*, 2013). Ce processus est régulé par une large gamme de facteurs bactériens tels que les *pili*, les protéines de la membrane externe (OmpA), la production d'exopolysaccharides, le système de régulation à deux composants BfmRS (Choi *et al.*, 2009; Gaddy and Actis, 2009; Loehfelm *et al.*, 2008; Tomaras *et al.*, 2003, 2008), mais également d'autres facteurs cellulaires et environnementaux, y compris les molécules de signalisation du quorum sensing, la température, la lumière et la disponibilité en fer (McConnell *et al.*, 2013).

8. Autres facteurs de virulence

Chez les bactéries comme chez les eucaryotes, les protéines sont soumises à des modifications post traductionnelles telle que la glycosylation (Weber *et al.*, 2016). Chez *A.baumannii*, elle est assurée en partie par une protéine appelée PglL. Il semblerait que ce processus joue un rôle dans la pathogenicité d'*A.baumannii*. Ainsi, la perte de glycosylation des protéines a entrainé des effets pléiotropiques sur la formation des biofilms et la survie des bactéries dans un modèle d'infection systémique chez les souris (Iwashkiw *et al.*, 2012).

Les bactéries élaborent des signaux chimiques secrétés afin d'établir la communication intercellulaire et de s'adapter aux conditions de l'environnement. Ainsi, la capacité de détecter la densité cellulaire afin d'exprimer un phénotype déterminé est connue sous le nom de « quorum sensing ». Ce système, largement décrit chez les bactéries Gram négatif, est impliqué dans plusieurs fonctions y compris la production des facteurs de virulence, la mobilité, la production d'antibiotiques, le transfert des plasmides, la bioluminescence et la formation des biofilms. Le quorum sensing contribue à la pathogenicité des *Acinetobacter* en contrôlant l'expression des gènes et en favorisant la formation des biofilms et par conséquent la survie et la résistance aux antibiotiques (Roca *et al.*, 2012).

Tableau 3: Principaux facteurs de virulence rapportés chez *A.baumannii*

Facteurs de virulence	Protéines	Role dans la pathogenese
Protéine de la membrane externe	OmpA	Induction de l'apoptose des cellules cibles, adhérence et invasion des cellules épithéliales, formation de biofilm, mobilité de surface, survie dans le sérum
Lipopolysacharide		Evasion de la réponse immunitaire de l'hôte, déclenchement de la réponse inflammatoire
Capsule		Evasion de la réponse immunitaire, croissance dans le sérum
Phospholipases	C/D	Survie dans le sérum, dissémination de la bactérie, apoptose des cellules cibles
protéines liant les pénicillines	PLP 7/8	Biosynthèse de peptidoglycane, stabilité cellulaire, croissance dans le sérum
Les systèmes de sécrétion	OMV	Transfert des facteurs de virulence et des matériels génétiques dans le cytoplasme des cellules,
	T2SS	Production de lipases, virulence atténuée en cas des mutations
	Ata	Adhérence, formation des biofilms
Acquisition de fer	Siderophore	Survie chez l'hôte, apoptose cellulaire
Formation de biofilms		Survie en milieu hospitalier sur les surfaces biotiques et abiotiques
Quorum sensing		Survie chez l'hôte, formation des biofilms

IX. Epidémiologie moléculaire d'*A.baumannii*

Les premières études de typage moléculaire chez *A.baumannii* ont été réalisées sur des souches épidémiques isolées d'hôpitaux européens géographiquement dispersés. Les résultats ont démontré l'occurrence de trois clones nommés initialement « clones Européens I-III ». Généralement, le terme « clone » est utilisé pour décrire un groupe d'isolats épidémiologiquement indépendants (obtenus à partir des sources différentes, à différents endroits et peut être à des moments différents) mais phénotypiquement et génotypiquement liés (Karah *et al.*, 2012). Par la suite, ces clones ont été retrouvés dans le monde entier et par conséquent ont été renommés clones internationaux (Diancourt *et al.*, 2010; Karah *et al.*, 2012). Dans ce paragraphe, nous rapportons une vue globale sur la répartition des clones majeurs qui ont été décrits par MLST, technique de référence utilisée pour étudier la structure de la population bactérienne. Parmi les terminologies utilisées dans ce paragraphe, le ST ou Séquence Type est défni par la combinaison des différents types d'allèles pour les 7 gènes de MLST, et le CC ou complexe clonal est défini comme l'ensemble des ST possédant 5 ou 6 allèles communs. Il est important de noter que les termes « complexe clonal » ou « clone » ne sont pas interchangeables. Ainsi, un complexe clonal représente un clone lorsqu'il renferme des souches épidémiologiquement non liées (Karah *et al.*, 2012).

1. Clone international 2

Le complexe clonal $CC92^{B}$ (identifié par MLST avec le schéma de Bartual) /$CC2^{P}$ (identifié par MLST avec le schéma de Pasteur), appelé également clone international 2, est le clone prépondérant au niveau mondial chez *A.baumannii*. Il a été rapporté en Europe (Italie, Espagne, Allemagne, Grèce, Pays Bas, Royaume-Uni, Danemark, République de la Tchèque, France, Pologne, Turquie, Norvège, Suède, Portugal, Irlande, Belgique, Roumanie), en Asie (Japon, Chine, Corée, Thaïlande, Inde, Malaisie, Philippines, Taiwan, Singapour, Vietnam, Liban, Népal, Iraq, Koweit), en Amérique (Brésil, Etats-Unis), en Afrique du Sud et du Nord ainsi qu'en Australie (figure 2) (Ganjo *et al.*, 2016; Karah *et al.*, 2012; Mathlouthi *et al.*, 2016; Shrestha *et al.*, 2015; Vali *et al.*, 2015). Ce clone inclut des souches épidémiques et multi-résistantes, notamment aux carbapénèmes (Karah *et al.*, 2012), mais aussi des souches résistantes à la colistine et à la tigécylcine (Diancourt *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2009).

L'utilisation d'autres techniques de typage a montré que le $CC92^{B}$/$CC2^{P}$ était étroitement lié au variant OXA-66 du gène intrinsèque *bla*$_{\text{OXA-51 like}}$, au SG1 (Sequence group) obtenu par

3LST, au WW2 (worldwide clone) obtenu par DiversiLab™, et au groupe II obtenu par AFLP (tableau 4) (Pournaras *et al.*, 2014; Zarrilli *et al.*, 2013).

Plusieurs facteurs ont été proposés pour expliquer la capacité de dissémination clonale du CC2. Le système immunitaire et le traitement par antibiotiques sont considérés comme des conditions de stress qui limitent l'évolution des bactéries cliniquement pertinentes. Ces éléments diminuent généralement la biodiversité et favorisent l'émergence des clones au sein d'une population bactérienne (Karah *et al.*, 2012).

La dissémination réussie du clone $CC92^{B}/CC2^{P}$ pourrait être principalement due à une large dissémination clonale d'un seul ancêtre qui serait à l'origine des épidémies internationales de grande ampleur (Karah *et al.*, 2012). Cette théorie est supportée par l'étude de Fu *et al.* qui ont rapporté que toutes les souches $ST92^{B}$ résistantes aux carbapénèmes et isolées de 5 régions différentes en Chine appartenaient à un même pulsotype (Fu *et al.*, 2010). De même, il a été montré dans une autre étude que parmi des souches $ST92^{B}$ isolées de trois continents, 8 possédaient des profils en champ pulsé reliés (Mugnier *et al.*, 2010). Enfin, la circulation locale, nationale et internationale de ce clone est probablement facilitée par la fréquence accrue des voyages internationaux, y compris par le transfert des patients entre différents hôpitaux et différents pays (Peleg *et al.*, 2008).

2. Clone international 1

Le $CC109^{B}/CC1^{P}$ ou clone international 1 est le $2^{ème}$clone majeur rapporté chez *A.baumannii,* montrant aussi une distribution mondiale dans plusieurs pays sur tous les continents (figure 2) (El-Shazly *et al.*, 2015; Karah *et al.*, 2012; Mathlouthi *et al.*, 2015; Shrestha *et al.*, 2015). De même, ce clone comporte plusieurs souches épidémiques et multi-résistantes et différents types de carbapénèmases ont été rapportés. Le $CC109^{B}/CC1^{P}$ est lié au variant OXA-69 du gène intrinsèque bla_{OXA-51}, au SG2 obtenu par 3LST, au WW1 obtenu par DiversiLab™, et au groupe I obtenu par AFLP (Pournaras *et al.*, 2014; Zarrilli *et al.*, 2013).

3. Clone international 3

Le CC187^{B}/CC3^{P} ou clone international 3 est un autre clone majeur chez *A.baumannii* comprenant plusieurs souches multi-résistantes et qui a été détecté dans plusieurs pays en Europe y compris en France, Allemagne, Espagne, Pays bas, Italie et Belgique, mais aussi aux Etats Unis, au Liban et en Iraq. Ce clone est lié au variant OXA-71 du gène intrinsèque *bla*$_{\text{OXA-51}}$, au SG3 obtenu par 3LST, au WW3 obtenu par DiversiLab^{TM}, et au groupe III obtenu par AFLP (Karah *et al.*, 2012; Pournaras *et al.*, 2014; Zarrilli *et al.*, 2013).

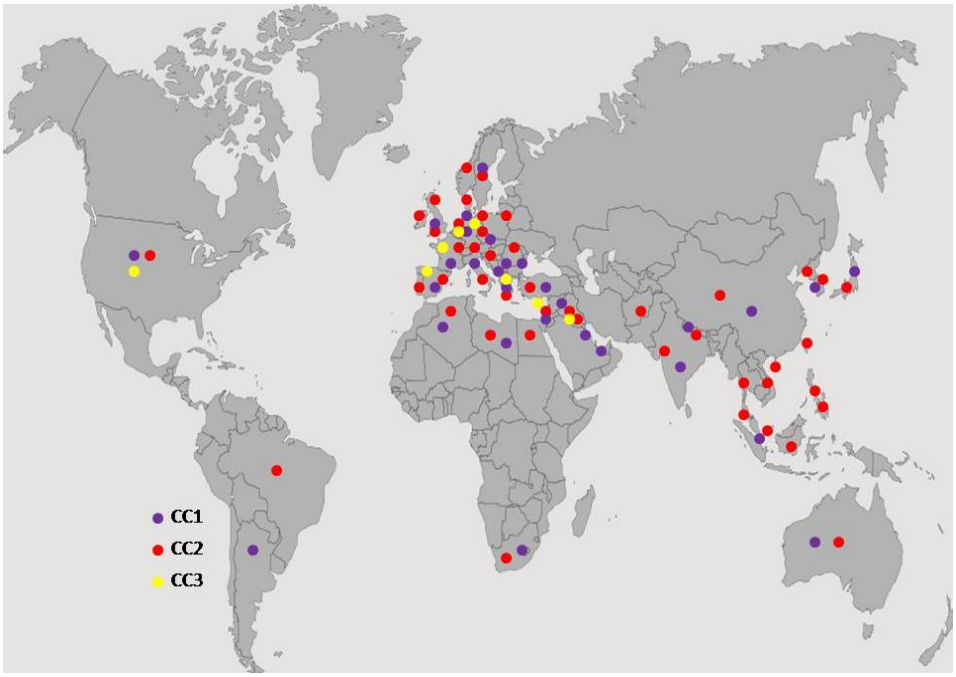


Figure 2: Dissémination mondiale des clones internationaux majeurs d'*A.baumannii*

4. Autres clones

Outre les clones majoritaires 1-3, le CC15^{P} est un autre clone international rapporté en Europe en en Amérique du Sud (Norvège, Portugal, République de la Tchèque, Turquie, Espagne, Grèce, Argentine et Brésil). Ce clone, qui comporte aussi des souches épidémiques, est lié au WW4 (DiversiLab), et les souches portent les variants *bla*$_{\text{OXA-51}}$ et *bla*$_{\text{OXA-132}}$ (Grosso *et al.*, 2011; Karah *et al.*, 2012; Pournaras *et al.*, 2014; Zarrilli *et al.*, 2013).

Des études d'épidémiologie moléculaire d'*A.baumannii* ont montré l'émergence d'autres clones internationaux dans plusieurs régions et pays, tels que le CC20^{B} (Europe, Afrique, Asie

de l'Est), CC110^{B} (Corée, Argentine, Etats Unis), CC32^{P} (Europe), CC25^{P} (Europe, Asie, Etats Unis), CC85^{P} (Europe, Asie), ainsi que d'autres STs qui avaient une distribution clonale ou qui étaient responsables d'épidémies au niveau national (Decousser *et al.*, 2013; Heydari *et al.*, 2015; Karah *et al.*, 2012; Rafei *et al.*, 2015b; Zarrilli *et al.*, 2013).

Il existe actuellement 993 séquences types décrites chez *A.baumannii* selon le schéma de MLST Pasteur et 1527 selon le schéma d'Oxford (http://pubmlst.org/ abaumannii/, consulté le 12/05/2017).

Tableau 4: Les principaux clones d'*A.baumannii* caractérisés par plusieurs techniques de typage

AFLP	Clones MLST (Pasteur)	Clones MLST (Bartual)	3LST	DiversiLab®	*bla*$_{OXA\text{-}51\text{-}like}$
I	CC1	CC109	SG2	WW1	OXA-69
II	CC2	CC92	SG1	WW2	OXA-66
III	CC3	CC187	SG3	WW3	OXA-71
Cluster A	CC15	CC103	SG5	WW4	OXA-51, OXA132
	ST78	ST196	SG6	WW6	OXA-90
	CC25	CC276	SG4	WW7	OXA-64
Cluster B	CC10		3/2/8*	WW8	OXA-68, OXA-128
Cluster 6	CC32	ST120			OXA-100
Cluster C	ST52				
	CC79	CC113			OXA-65
	CC85		8/10/11*		OXA-94

(Karah *et al.*, 2012; Pournaras *et al.*, 2014; Sahl *et al.*, 2015; Zarrilli *et al.*, 2013)

* aucun SG n'a été assigné, CC : clonal complex, ST : Sequence type, SG : Sequence group, WW : worldwide, OXA : Oxacillinase

X. Epidémiologie moléculaire d'*A.baumannii* au Liban

Au Liban, avec le début des hostilités (guerre civile), les infections nosocomiales dues à *A.baumannii* ont augmenté de façon considérable. La première étude analysant l'épidémiologie de cette espèce a été réalisée dans l'Hôpital Universitaire Américain de Beyrouth et a été publiée en 1992. Trente-six souches d'*A.baumannii* isolées pendant dix mois des patients hospitalisés et obtenues de sources différentes ont été analysées. Comme résultats, Matar *et al.*

ont montré que 21 souches avaient le même profil d'antibiogramme et que 95% (n=20) de ces souches avaient le même profil de plasmide et des protéines totales. En outre, il a été suggéré qu'une même souche a été présente dans au moins 6 services de l'hôpital (Matar *et al.*, 1992). Une autre épidémie a été observée entre 2004 et 2005 à l'hôpital universitaire Saint George à Beyrouth, 17 souches résistantes aux carbapénèmes appartenant au clone international 1 (ST2 par 3LST) ont été isolées, le taux de mortalité était de 35%. Le seul mécanisme de résistance aux carbapénèmes retrouvé chez les souches était la production de la carbapénémase OXA-58, portée par un plasmide dénommé pABIR (Zarrilli *et al.*, 2008). Par la suite, la circulation des trois clones internationaux a été rapportée (Di Popolo *et al.*, 2011).

Après le début des conflits en Syrie, l'épidémiologie d'*A.baumannii* au Liban a été influencée par l'immigration des Syriens vers les régions libanaises et surtout les patients et les blessés hospitalisés dans les hôpitaux libanais. Ainsi, en 2014, Rafei *et al.* ont rapporté pour la première fois la présence de souches d'*A.baumannii* résistantes aux carbapénèmes portant le gène NDM-1 et appartenant au clone CC85. Ces souches ont été isolées des plaies des patients syriens rapatriés au Liban (Rafei *et al.*, 2014a).

D'autres études d'épidémiologie moléculaire d'*A.baumannii* ont ensuite été réalisées. Elles ont montré que le CC2 était le clone majoritaire, circulant dans plusieurs hôpitaux du Liban, et à moindre degré, les CC1, CC25 et CC85. En outre, plusieurs nouveaux séquences types ont été décrits (Rafei *et al.*, 2014c, 2015b). Une autre étude épidémiologique réalisée sur des souches isolées de plusieurs hôpitaux au Liban a montré la présence de 18 pulsotypes par ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR) (Hammoudi *et al.*, 2015).

XI. Mécanismes de résistance aux antibiotiques

L'émergence et la diffusion des bactéries multi-résistantes sont des problèmes majeurs et préoccupants. Cela est particulièrement vrai pour les agents pathogènes nosocomiaux tels que les *Acinetobacter* (Potron *et al.*, 2015). Ces espèces sont capables de résister à plusieurs classes d'antibiotique en raison des mécanismes intrinsèques ou naturels, mais surtout acquis au cours du temps. En effet, l'utilisation non contrôlée d'antibiotiques à large spectre a contribué à la sélection et à l'émergence des souches multi-résistantes, voire pan-résistantes ce qui pose de nombreuses difficultés thérapeutiques. Du fait de son implication clinique largement dominante

par rapport aux autres espèces du genre, la résistance aux antibiotiques chez *A.baumannii* a été la plus étudiée, même si un intérêt grandissant est porté sur la résistance aux antibiotiques des autres espèces d'*Acinetobacter* (Espinal *et al.*, 2011). En 2012, Magiorakos *et al.* ont proposé des définitions pour les souches d'*A.baumannii* aux antibiotiques : MDR (Multidrug-Resistant) lorsque la souche est résistante à au moins un antibiotique dans au moins 3 familles, XDR (Extensively Drug-Resistant), lorsqu'elle est résistante à au moins un antibiotiques dans toutes les classes sauf 2, et PDR (Pandrug-Resistant) lorsque la souche est résistante à tous les antibiotiques dans toutes les classes (Magiorakos *et al.*, 2012).

Les *Acinetobacter* sont naturellement résistants aux aminopenicillines, à l'aztréonam, aux céphalosporines de 1ère et 2ème génération, à l'ertapénème, à la fosfomycine, au triméthoprime et aux furanes.

1. Résistance acquise aux ß -lactamines

1.1. Mécanismes enzymatiques

1.1.1. Les ß-lactamase classe A

Les ß-lactamases appartenant à la classe A de la classification d'Ambler ont été rapportées chez *Acinetobacter* spp bien qu'elles semblent d'intérêt mineur au vu de leur faible prévalence. Différentes ß-lactamases ont été décrites chez *A.baumannii* et autres espèces telles que TEM-1, TEM-2, CARB-4, CARB-5, CARB-14, SHV-1, SHV-56, SHV-71 et SCO-1 (Bonnin *et al.*, 2013a). Ces enzymes hydrolysent les pénicillines à spectre étroit, mais pas les céphalosporines et les carbapénèmes, et sont inhibées par l'acide clavulanique et le tazobactam (Potron *et al.*, 2015).

Les ß-lactamases à spectre étendue (BLSE) conférant une résistance aux céphalosporines de 3ème génération ont également été retrouvées. PER-1 a été la première enzyme de type BLSE décrite chez *A.baumannii*, en Belgique (Vahaboglu *et al.*, 1997), et est devenue plus tard très répandue en Turquie, Hongrie, Romanie, Russie, Belgique, Bulgarie, France, Corée de Sud, Inde, Chine, Iran et Kowait (Almasaudi, 2016; Kolayli *et al.*, 2005; Potron *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2007; Yong *et al.*, 2003). Plusieurs variants de cette enzyme ont été par la suite rapportés, comme PER-2 en Amérique du sud (Pasterán *et al.*, 2006), PER-3 en Egypte (Al-Hassan *et al.*, 2013), PER-7 en France (Bonnin *et al.*, 2011a) et aux Emirats Arabe Unis (Opazo *et al.*, 2012).

D’autres enzymes de type BLSE ont été identifiées chez *A.baumannii* dans plusieurs pays autour du monde (tableau 4): VEB- (1, 3, et 7) (Huang *et al.*, 2008; Poirel *et al.*, 2003; Potron *et al.*, 2015), GES- (11, 12,et 22) (Bogaerts *et al.*, 2010; Castanheira *et al.*, 2014; Hammami *et al.*, 2017; Moubareck *et al.*, 2009), et RTG-4 qui était une BLSE atypique avec une activité carbénicillinase hydrolysant le céfépime et le cefpirome plutôt que la ceftazidime (Potron *et al.*, 2009). Enfin, les BLSE de type TEM, SHV et CTX-M fréquemment répandues chez les entérobactéries ont été rarement détectées chez *A.baumannii* (Potron *et al.*, 2011, 2015; Shakil and Khan, 2010).

Bien que la quasi-totalité des BLSE de classe A ne possède pas une activité carbapénèmase, des variants spécifiques de GES tel que le GES-14 détectée en France en 2011, ont montré une capacité à compromettre l'efficacité des carbapénèmes. Le gène *bla*$_{\text{GES-14}}$ a été localisé sur un intégron de classe 1 porté par un plasmide transférable (Bonnin *et al.*, 2011b). KPC, une autre carbapénèmase de classe A très répandue chez les entérobactéries, a été également détectée mais rarement chez des souches d’*A.baumannii*, au Porto Rico (Robledo *et al.*, 2010, 2011) et en Iran (Azimi *et al.*, 2015).

1.1.2. Les ß-lactamases Classe B

Les enzymes de cette classe possèdent un ou deux atomes de zinc dans leur site actif et sont aussi dénommées Métallo-ß-Lactamases (MBL). Elles hydrolysent les carbapénèmes et autres ß-lactames à l’exception de l’aztreonam, et ne sont pas inhibées par les inhibiteurs classiques des ß-lactamases tels que l’acide clavulanique et le tazobactam. Cependant, les chélateurs de métaux peuvent inhiber l’activité de ces enzymes (Nordmann *et al.*, 2012; Walsh *et al.*, 2005). De nombreux groupes de MBL ont été décrits à ce jour comme IMP, VIM, NDM, SPM, GIM, SIM, DIM, KHM, TMB, FIM et AIM (Poirel and Nordmann, 2006; Zhao and Hu, 2015).

L’IMP, ou Imipénème Metallo-ß-Lactamase, d’abord décrite chez une souche de *P.aeruginosa* au Japon en 1990, a par la suite été rapportée mondialement chez d’autres bacilles à Gram négatif, y compris *A.baumannii* (Roca *et al.*, 2012). A ce jour, 9 variants de cette enzyme ont été identifiés chez *A.baumannii*, dans la plupart des cas en Asie, mais également en Europe et en Amérique du Sud. En outre, les enzymes de type IMP ont été fréquemment rapportées en Asie et en Australie chez les *Acinetobacter* non *baumannii* (tableau 5) (figure 3)

(Endo *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2010; Kouyama *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2009c; Lin *et al.*, 2010; Peleg *et al.*, 2006; Sung *et al.*, 2014).

L'enzyme VIM ou Verona Imipenemase, a été décrite dès 1999 en Italie chez un isolat de *P.aeuriginosa* (Lauretti *et al.*, 1999). Quelques années plus tard elle a été identifiée chez des souches d'*A.pittii* résistantes aux carbapénèmes isolées en Corée (Yum *et al.*, 2002). Les enzymes de type VIM partagent moins de 40% d'identité des acides aminés avec les enzymes de type IMP. Plusieurs variants de VIM ont été détectés chez plusieurs espèces d'*Acinetobacter* spp dans la plupart des cas en Europe et dans les pays Asiatiques (Kim *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2009c; Lin *et al.*, 2010; Potron *et al.*, 2015; Sung *et al.*, 2014).

L'enzyme SIM-1 ou Seoul Imipenemase a été rapportée uniquement chez un isolat d'*A.baumannii* isolé à Seoul, Corée de Sud (Lee *et al.*, 2005). L'identité entre les séquences d'acides aminés de SIM-1 et IMP varie entre 64 et 69%. Cette enzyme a également été rapportée par la suite chez une souche d'*A.bereziniae* en Corée de Sud (Kim *et al.*, 2010).

L'enzyme GIM-1 a été rapporté uniquement chez *A.pittii* en Allemagne (Kaase *et al.*, 2014).

Enfin, NDM-1 ou New-Delhi Metallo-ß-Lactamase est une autre enzyme de classe B décrite pour la première fois en 2009 chez des souches d'entérobactéries isolées en Inde (Yong *et al.*, 2009). Depuis cette date, le gène $bla_{\text{NDM-1}}$ a diffusé largement parmi les entérobactéries. Cependant, de nombreuses études ont rapporté l'acquisition de ce gène $bla_{\text{NDM-1}}$ chez *A. baumannii.* En 2010, la première identification de NDM-1 chez *A.baumannii* a eu lieu en Inde. Les souches ont été isolées des patients hospitalisés en unité de soins intensifs (Karthikeyan *et al.*, 2010). Plus tard, divers études ont rapporté l'émergence des souches d'*A.baumannii* produisant NDM-1 dans plusieurs pays autour du monde y compris au Liban (tableau 5) (Bonnin *et al.*, 2014a; Potron *et al.*, 2015; Rafei *et al.*, 2014a; Zenati *et al.*, 2016). Un variant, NDM-2, a ensuite été identifié chez une souche d'*A.baumannii* isolée en Allemagne chez un patient rapatrié d'Egypte (Kaase *et al.*, 2011), puis au Moyen-Orient (Potron *et al.*, 2015). Ces gènes peuvent être plasmidiques ou chromosomiques, souvent associés au transposon de type Tn125 et ses dérivés (Bonnin *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2011).

De même, les enzymes de type NDM ont été largement identifiées chez les espèces non *baumannii* au cours de ces dernières années. Ainsi, le NDM-1 a été décrit pour la première fois en 2012 chez une souche d'*A.lwoffii* isolée en Chine (Hu *et al.*, 2012). Par la suite, plusieurs études ont rapporté la détection de souches d'*Acinetobacter* non *baumannii* produisant NDM-1 notamment en Chine (Chen *et al.*, 2012; Fu *et al.*, 2012, 2015; Li *et al.*, 2015b; Sun *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2012), en Afghanistan (McGann *et al.*, 2013a), en Croatie (Bošnjak *et al.*, 2014), Turquie (Roca *et al.*, 2014), Paraguay (Pasteran *et al.*, 2014) et Brésil (Pagano *et al.*, 2015).

D'autre part, cette enzyme a aussi été détectée en dehors des hôpitaux. Ainsi en Chine, plusieurs études ont montré sa présence chez des souches d'*A.lwoffii, A.johnsonii, A.calcoaceticus et A.junii* isolées d'échantillons animaux, des eaux usées et des sols (Wang and Sun, 2015; Wang *et al.*, 2012; Zong and Zhang, 2013). Ces résultats mettent en évidence probablement une transmission zoonotique et ou environnementale de cette carbapénémase, et suggèrent que les eaux usées des hôpitaux peuvent être un réservoir potentiel des déterminants de la résistance aux antibiotiques.

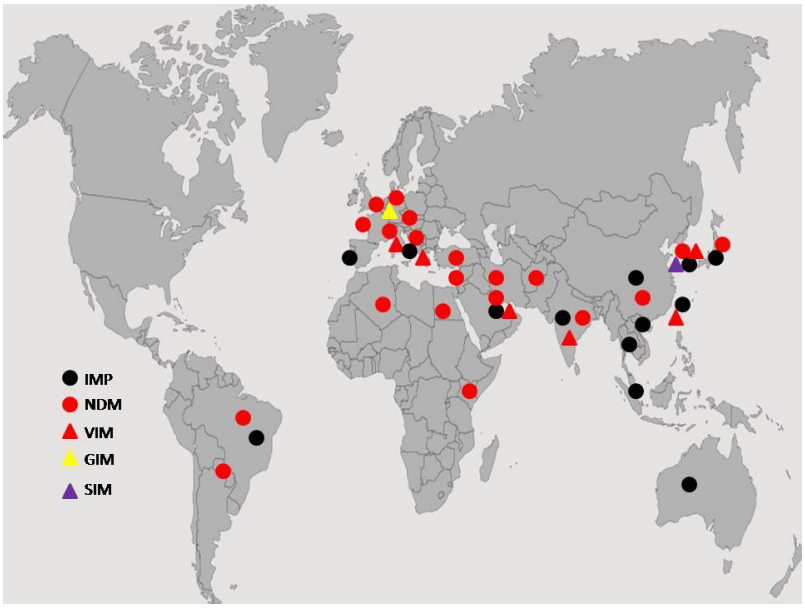


Figure 3: Cartographie de la dissémination mondiale des Métallo-ß-lactamases

1.1.3. Les ß-lactamases de Classe C

A.baumannii possède naturellement un gène qui code pour une céphalosporinase de type AmpC. Ce gène est souvent exprimé à faible niveau, ainsi la quantité produite de l'enzyme AmpC n'a pas d'impact sur l'activité des céphalosporines à spectre élargi (Bou and Martínez-Beltrán, 2000). Cependant, la présence des séquences d'insertion telle que l'ISAba1 en amont du gène *amp*C augmente son expression, ce qui confère la résistance aux céphalosporines à large spectre (Héritier *et al.*, 2006). Plusieurs variants de ces enzymes ont été identifiés chez les souches d'*A.baumannii* et sont ainsi nommés enzymes de type ADC (*Acinetobacter*- Derived Cephalosporinase) (Hujer *et al.*, 2005). De façon remarquable, certains de ces variants possèdent une activité contre les céphalosporines de 4eme génération d'où le nom ESAC pour Extended - Spectrum AmpC (Tian *et al.*, 2011).

Les céphalosporinases de type ADC ont aussi été décrites chez les *Acinetobacter* non *baumannii* y compris *A.pittii* et *A.nosocomialis*.

1.1.4. Les ß-lactamases Classe D

Les ß-lactamases de classe D ou oxacillinases constituent un groupe hétérogène qui est capable d'hydrolyser aussi bien l'oxacilline et la cloxacilline que les benzylpénicillines, d'où le préfixe OXA. Ces enzymes ne sont pas inhibées par l'acide clavulanique ni les autres inhibiteurs. En outre, certaines enzymes de cette classe possèdent une activité carbapénémase d'où le nom CHDLs pour carbapenem-hydrolysing classe D ß-lactamases (Poirel *et al.*, 2010). Les CHDLs sont les carbapénémases les plus répandues chez *Acinetobacter* spp (Bonnin *et al.*, 2013a).

A.baumannii possède naturellement un gène qui code pour une enzyme de classe D, appelée OXA-51. Cette enzyme a une faible activité carbapénémase et le gène correspondant ne s'exprime pas chez la plupart des isolats. Cependant, la présence de la séquence d'insertion ISAba1 en amont du gène confère une sensibilité réduite aux carbapénèmes (Héritier *et al.*, 2005; Turton *et al.*, 2006b). Plusieurs variants d'OXA-51 ont été répertoriés, ce qui reflète le niveau de l'évolution de ce gène, probablement en réponse à une pression sélective liée à l'utilisation des antibiotiques (Evans and Amyes, 2014).

En outre, plusieurs CHDLs acquises ont été identifiées chez *A.baumannii* (Peleg *et al.*, 2008). Ces enzymes induisent une sensibilité réduite aux carbapénèmes mais les cephalosporines à large spectre restent intactes. Ainsi, le niveau de résistance élevé souvent observé chez plusieurs souches d'*A.baumannii* résulte de l'association d'un CHDL et d'un autre mécanisme y compris la perte des porines ou la surexpression des systèmes d'efflux (Poirel and Nordmann, 2006). Cinq groupes essentiels de CHDLs acquises ont été décrits chez *A.baumannii* notant les enzymes de type OXA-23, OXA-24/40, OXA-58, OXA-143 et OXA-235.

OXA-23 (initialement ARI-1), partageant 56 % d'homologie avec OXA-51 est la première enzyme qui a été observée chez une souche d'*A.baumannii* résistante à l'imipénème et isolée en Ecosse. Par la suite, les enzymes de type OXA-23 ont été largement répandues en Afrique, Amérique, en Asie, et en Australie non seulement chez des souches épidémiques d'*A.baumannii* (figure 4) (Merino *et al.*, 2014; Poirel *et al.*, 2010; Potron *et al.*, 2015), mais également chez d'autres espèces y compris *A.junii* (Marqué *et al.*, 2005), *A.pittii* (Lee *et al.*, 2007), *A.nosocomialis* (Liu *et al.*, 2015), et *A.radioresistens* (Lee *et al.*, 2009b; Mendes *et al.*, 2009; Poirel *et al.*, 2008a). A ce jour, plusieurs variants d'OXA-23 codés par des gènes chromosomiques ou plasmidiques ont été rapportés, et sont généralement associés à des transposons de type Tn2006, Tn2007 et Tn2008 ou des séquences d'insertion ISAbaI (Evans and Amyes, 2014; Mugnier *et al.*, 2010).

Le second groupe de CHDLs acquises identifié chez *A.baumannii* est l'OXA-24/40-like. Ce groupe renferme plusieurs variants dont l'OXA-24 ou OXA-40 et a été identifié pour la première fois chez des souches d'*A.baumannii* résistantes aux carbapénèmes isolées en Espagne (Bou *et al.*, 2000b). Les différents variants de ce groupe, de localisation chromosomique ou plasmidique, ont ensuite été largement rapportés chez *A.baumannii* en Espagne et au Portugal ainsi que dans d'autres pays (figure 5) (Afzal-Shah *et al.*, 2001; Da Silva *et al.*, 2004; Héritier *et al.*, 2003; Lolans *et al.*, 2006; Potron *et al.*, 2015). De même, les OXA-24-like ont également été identifiées chez les *Acinetobacter* non *baumannii* en Espagne (Cayo *et al.*, 2014; Merino *et al.*, 2010), France (Bonnin *et al.*, 2014b), Chine (Lee *et al.*, 2009b), Colombie (Montealegre *et al.*, 2012), et au Liban (Rafei *et al.*, 2015a).

Le 3eme groupe de CHDL correspond à l'OXA-58-like qui a été décrit pour la première fois en France, à partir d'une souche d'*A.baumannii* résistante aux carbapénèmes (Poirel *et al.*, 2005). Par la suite, cette enzyme a diffusé largement en Europe comme en Italie en Grèce chez des souches d'*A.baumannii* responsables d'épidémies dans des unités de soins intensifs (Poirel *et al.*, 2010; Potron *et al.*, 2015; Roca *et al.*, 2012), mais également chez d'autres espèces d'*Acinetobacter*, notamment en Asie (Chen *et al.*, 2010; Fu *et al.*, 2014; Marti *et al.*, 2008a). L'oxacillinase OXA-58 est codée par un gène fréquemment d'origine plasmidique associé à des séquences d'insertion (ISAba1, ISAba2, ISAba3, IS18) (Bonnin *et al.*, 2013a; Potron *et al.*, 2015). D'autres variants de cette enzyme ont été décrits plus tard, à savoir l'OXA-96 et l'OXA-97 qui dérivent d'une mutation ponctuelle au niveau du gène codant l'OXA-58 et qui possèdent les mêmes propriétés hydrolytiques. Ces enzymes ont été décrites à Singapore et en Tunisie respectivement (Koh *et al.*, 2007; Poirel *et al.*, 2008b).

L'OXA-143 like est le 4ème groupe de CHDL qui a été rapporté. Il a initialement été décrit chez une souche d'*A.baumannii* résistante à l'imipénème et isolée en 2004 au Brésil. Il est porté sur un plasmide de 30 kb et n'est pas associé avec des séquences d'insertion ou encore des intégrons. Cette enzyme partage 88% des acides aminés avec l'OXA-24, 63% avec l'OXA-23 et 52% avec l'OXA-58 (Higgins *et al.*, 2009). En 2014, un variant de l'OXA-143, appelé OXA-253, codé par un gène plasmidique a été détecté au Brésil, chez une souche clinique d'*A.baumannii* (Girlich *et al.*, 2014). OXA-182 (codé par un gène plasmidique) et OXA-255 (codé par un gène chromosomique) sont deux autres variants de ce groupe qui ont été détectés chez *A.nosocomialis* et *A.pittii* en Corée et aux Etats-Unis respectivement (Lee *et al.*, 2013; Zander *et al.*, 2014).

Enfin, un dernier groupe d'oxacillinases, nommé l'OXA-235-like, a été caractérisé en 2013 à partir des souches isolées aux Etats-Unis et au Mexique. Les séquences d'acides aminés déduites partageaient 54 à 57% d'identité avec OXA-23, OXA-24, OXA-58 et OXA-143, et 56% avec OXA-51. Ce group comprend chez *A.baumannii* trois variants (OXA-235, OXA-236, OXA-237) dont les gènes sont présents sur le chromosome ou sur un plasmide, encadrés par deux copies de l'ISAba1 (Higgins *et al.*, 2013).

Finalement, plusieurs gènes OXA ont été décrits chez d'autres espèces mais sans avoir un effet sur les carbapénèmes ni sur d'autres antibiotiques (Périchon *et al.*, 2014).



Figure 4: Cartographie de la dissémination mondiale du gène *bla*$_{\text{OXA-23-like}}$

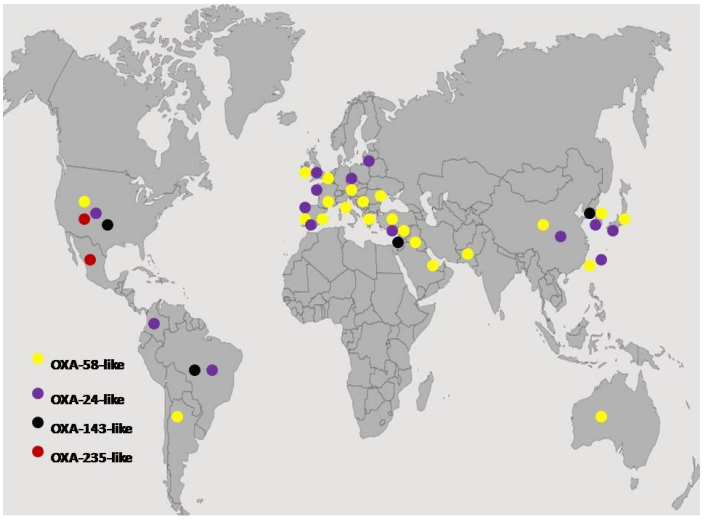


Figure 5: Cartographie de la dissémination d'autres Oxacillinases

(OXA-24-like, OXA-58-like, OXA-143-like, OXA-235-like)

2. Mécanismes non enzymatiques

Les mécanismes de résistance non enzymatiques chez *A.baumannii* sont moins fréquents mais font l'objet d'un nombre croissant de publications. Les mécanismes enzymatiques et non-enzymatiques peuvent être associés dans une même souche. Parmi ces mécanismes, on cite, la perte ou la modification des porines, les systèmes efflux et la modification des protéines liant les pénicillines (PLP).

2.1.1. Diminution de la perméabilité membranaire

Des modifications de la perméabilité membranaire chez *A.baumannii* peuvent jouer un rôle important dans la résistance, notamment aux carbapénèmes. Ainsi, la perte de la protéine de membrane externe (OMP) CarO (29 kDa), 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 al.*, 2005). D'autres protéines de la membrane externe ont également été identifiées comme un déterminant de la résistance aux ß-lactamines : OMPs de 47 kDa, 44 kDa et 33 kDa, OMPs de 22 et 33 kDa, Heat- modifiable protein (HMP-AB) de 33-36 kDa et 43 kDa (Almasaudi, 2016; Roca *et al.*, 2012).

2.1.2. Les pompes à efflux

L'implication dans la multi-résistance aux antibiotiques des systèmes d'efflux d'origine naturels ou acquis est de plus en plus rapportée. Parmi les superfamilles de pompes à efflux, les systèmes RND (Resistance-Nodulation-Division) sont les plus fréquents chez *A. baumannii*. Les pompes RND comme l'AdeABC ou l'AdeIJK présentent typiquement un large spectre de substrats incluant des antibiotiques, des antiseptiques ou des détergents (Coyne *et al.*, 2011). La surexpression de l'AdeABC est associée à une augmentation du niveau de résistance à l'imipénème et au méropénème, surtout lorsqu'elle est associée à l'expression des enzymes de type CHDL (Lee *et al.*, 2010; Perez *et al.*, 2007). AdeIJK est une pompe spécifique d'*A.baumannii* qui contribue à la résistance intrinsèque de bas niveau aux ß-lactamines et aux autres antibiotiques (Damier-Piolle *et al.*, 2008).

2.1.3. Modification des Protéines Liant les Pénicillines (PLP)

A ce jour, plusieurs PLP ont été décrites chez *A.baumannii*. La résistance aux carbapénèmes serait due à une baisse de l'affinité vis-à-vis des PLPs par des mutations qui confèrent une diminution de l'expression de PLP2 et PLP6b (Cayô *et al.*, 2011; Perez *et al.*, 2007).

Tableau 5: Récapitulatif des différentes ß-lactamases décrites chez *Acinetobacter* spp

Classification d'Ambler	Enzymes	Espèces	Support génétique	Pays de l'isolement	Références
Classe A	PER-1	*A.baumannii*	C, P	Belgique, Turquie, Hongrie, Romanie, Russie, Bulgarie, France, Corée de Sud, Inde, Chine, Iran, Kuwait	(Potron *et al.*, 2015)
		A.pittii		Corée de Sud	(Yong *et al.*, 2003)
	PER-2	*A.baumannii*	-	Amérique du Sud	(Pasterán *et al.*, 2006)
	PER-3	*A.baumannii*	C	Egypte	(Al-Hassan *et al.*, 2013)
	PER-7	*A.baumannii*	C, P	France, Emiraties Arabe Unis	(Bonnin *et al.*, 2011a; Opazo *et al.*, 2012)
	VEB-1	*A.baumannii*	C	France, Argentine, Belgique, Iran	
	VEB-3	*A.baumannii*	-	Taiwan	(Huang *et al.*, 2008)
	VEB-7	*A.baumannii*	-	Etats Unis	(Potron *et al.*, 2015)
	GES-11	*A.baumannii*	P	France, Belgique, Suède, Turquie, Tunisie, Kuwait	(Hammami *et al.*, 2017; Moubareck *et al.*, 2009; Potron *et al.*, 2015)
	GES-12	*A.baumannii*	P	Belgique, Tunisie	(Bogaerts *et al.*, 2010; Hammami *et al.*, 2017)
	GES-14	*A.baumannii*	P	France	(Bonnin *et al.*, 2011b)
	GES-22	*A.baumannii*		Turquie	(Castanheira *et al.*, 2014)
	SHV-5	*A.baumannii*	C	Etats Unis	(Naas *et al.*, 2007)
	SHV-12	*A.baumannii*	P	Pays bas	(Naiemi *et al.*, 2005)
	TEM-92	*A.baumannii*	-	Italie	(Endimiani *et al.*, 2007)
	TEM-116	*A.baumannii*	P	Pays bas	(Naiemi *et al.*, 2005)
	CTX-M-2	*A.baumannii*	P	Japon, Etats Unis	(Adams-Haduch *et al.*, 2008; Nagano *et al.*, 2004)
	CTX-M-15	*A.baumannii*	C,P	Inde, Haiti	(Potron *et al.*, 2011; Shakil and Khan, 2010)
	CTX-M-43	*A.baumannii*	-	Bolivie	(Celenza *et al.*, 2006)
	RTG-4	*A.baumannii*	P	France	(Potron *et al.*, 2009)
	KPC-(2,3,10)	*A.baumannii*	-	Porto Rico, Iran	(Azimi *et al.*, 2015; Robledo *et al.*, 2010, 2011)
Classe B	IMP-1	*A.baumannii*	I	Italie, Japon, Corée, Inde, Taiwan, Kuwait	(Potron *et al.*, 2015)
		A.pittii, *A.nosocomialis*	I	Taiwan, Corée, Japon	(Kim *et al.*, 2010; Kouyama *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2009c; Lin *et al.*, 2010; Sung *et al.*, 2014)
		A.calcoaceticus, *A.lwofii*	I	Japon	(Endo *et al.*, 2014; Kouyama *et al.*, 2012)
		A.bereziniae	I	Corée de Sud	(Sung *et al.*, 2014)

Classification d'Ambler	Enzymes	Espèces	Support génétique	Pays de l'isolement	Références
		A.radioresistens	I	Taiwan	(Lee *et al.*, 2009c)
		A.ursingii, *A.soli*	I	Japon	(Endo *et al.*, 2014)
	IMP-2	*A.baumannii*	I	Japon, Italie	(Riccio *et al.*, 2000; Shibata *et al.*, 2003)
		A.nosocomialis	-	Japon	(Kouyama *et al.*, 2012)
	IMP-4	*A.baumannii*	I	Hong Kong, Australie, Singapore	(Potron *et al.*, 2015)
		A.pittii, *A.nosocomialis*, *A.calcoaceticus*	C	Chine	(Chu *et al.*, 2001)
		A.junii		Australie	(Peleg *et al.*, 2006)
	IMP-5	*A.baumannii*	I	Portugal	(Da Silva *et al.*, 2002)
	IMP-6	*A.baumannii*	-	Brésil	(Gales *et al.*, 2003)
	IMP-8	*A.baumannii*	I	Chine	(Wang *et al.*, 2007)
		A.pittii, *A. genomspecies 14 TU*	I	Taiwan	(Lee *et al.*, 2009c)
	IMP-11	*A.baumannii*	-	Japan	(Potron *et al.*, 2015)
	IMP-14	*A.baumannii*	I	Thailand	(Kansakar *et al.*, 2011)
	IMP-19	*A.baumannii*	-	Japon	(Yamamoto *et al.*, 2011)
	VIM-1	*A.baumannii*	I	Grèce	(Tsakris *et al.*, 2006)
	VIM-2	*A.baumannii*	I	Corée du Sud, Kuwait	(Al-Sweih *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2003)
		A.pittii	I	Corée du Sud	(Kim *et al.*, 2010; Yum *et al.*, 2002)
		A.nosocomialis	I	Corée du Sud	(Lee *et al.*, 2007; Sung *et al.*, 2014)
		A.calcoaceticus	-	Corée du Sud	(Lee *et al.*, 2009b)
		A.genomspecies 14 TU	-	Corée du Sud	(Kim *et al.*, 2010)
	VIM-4	*A.baumannii*	-	Italie	(Mammina *et al.*, 2011)
	VIM-6	*A.baumannii*	-	Inde	(Potron *et al.*, 2015)
	VIM-11	*A.baumannii*	I	Taiwan	(Huang *et al.*, 2008)
		A.nosocomialis, *A.junii*	I	Taiwan	(Lee *et al.*, 2009c; Lin *et al.*, 2010)
	SIM-1	*A.baumannii*, *A.bereziniae*	I	Corée de Sud	(Kim *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2005)
	GIM-1	*A.pittii*	I	Allemagne	(Kaase *et al.*, 2014)
	NDM-1	*A.baumannii*	C, P	Inde, Tchèque, Allemagne, Belgique, Slovénie, France, Suisse, Chine, Japon, Liban, Syrie, Brésil, Algérie, Kenya, Iran	(Karthikeyan *et al.*, 2010; Potron *et al.*, 2015; Rafei *et al.*, 2014a; Shokri *et al.*, 2017)
		A.pittii	P	Chine, Liban, Turquie, Paraguay, Brésil, France	(Al Atrouni *et al.*, 2016a; Pagano *et al.*, 2015; Pailhoriès *et al.*, 2016a; Pasteran *et al.*, 2014; Roca *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2012)

Classification d'Ambler	Enzymes	Espèces	Support génétique	Pays de l'isolement	Références
		A.junii, A.lwoffii	P	Chine	(Hu *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2012)
		A.haemolyticus, A.johnsonii, A.bereziniae, A.genomspecies 15 TU	P	Chine	(Fu *et al.*, 2012)
		A.calcoaceticus	P	China	(Li *et al.*, 2015b; Sun *et al.*, 2014; Wang and Sun, 2015)
		A.shindleri	P	Afghanistan	(McGann *et al.*, 2013b)
		A.guillouaie	C	Croatie	(Bošnjak *et al.*, 2014)
	NDM-2	*A.baumannii*	C	Egypte, Emiraties Arabes Unis	(Ghazawi *et al.*, 2012; Kaase *et al.*, 2011)
Classe C	ADC	*A.baumannii*	C		(Hujer *et al.*, 2005; Potron *et al.*, 2015)
		A.pittii, A.nosocomialis	C		(Espinal *et al.*, 2011)
Classe D	OXA-51 like	*A.baumanii*	C	Répartition mondiale	(Evans and Amyes, 2014)
	OXA-23 like	*A.baumannii*	C, P	Répartition mondiale	(Poirel *et al.*, 2010; Potron *et al.*, 2015)
		A.pittii	-	Corée de Sud	(Lee *et al.*, 2007)
		A.nosocomialis	P	Chine	(Liu *et al.*, 2015)
		A.junii	P	Romanie	(Marqué *et al.*, 2005)
		A.radioresistens	C, P	Corée de Sud, Inde,	(Lee *et al.*, 2009b; Mendes *et al.*, 2009; Poirel *et al.*, 2008a)
	OXA-24 like	*A.baumannii*	C, P	Belgique, Espagne, France, Portugal, Brésil, Lituanie, Croatie, Chine, Japon, Corée, Taiwan…	(Poirel *et al.*, 2010; Potron *et al.*, 2015)
		A.calcoaceticus	P	Espagne, Liban	(Al Atrouni *et al.*, 2016d; Merino *et al.*, 2010)
		A.pitti,	P	Colombie, France, Corée de Sud, Espagne	(Bonnin *et al.*, 2014c; Cayo *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2009b; Montealegre *et al.*, 2012)
		A.baylyi	-	Corée de Sud	(Lee *et al.*, 2009b)
	OXA-58 like	*A.baumannii*	P	France, Belgique, Turquie, Grèce, Italie, Etats Unis, Argentine, Australie, Liban….	(Poirel *et al.*, 2010; Potron *et al.*, 2015)
		A.pitii, A.nosocomialis, A.genomspecies 14 TU	C, P	Espagne, Taiwan, Chine	(Chen *et al.*, 2010; Fu *et al.*, 2012; Kouyama *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2009c; Lin *et al.*, 2010; Marti *et al.*, 2008a)
		A.junii	P	Australie, Taiwan	(Lee *et al.*, 2009c; Peleg *et al.*, 2006)
		A.calcoaceticus	P	Corée de Sud	(Lee *et al.*, 2009b)
		A.soli, A.ursingii	P	Japon	(Endo *et al.*, 2014)
		A.guillouaie, A. phenon 6/ct13TU	C,P	Croatie, Espagne	(Bošnjak *et al.*, 2014; Marti *et al.*, 2008b)

Classification d'Ambler	Enzymes	Espèces	Support génétique	Pays de l'isolement	Références
	OXA-143 like	*A.baumannii, A.noscomialis, A.pittii*	P	Brésil, Corée de Sud, Etats Unis	(Girlich *et al.*, 2014; Higgins *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2013; Zander *et al.*, 2014)
	OXA-235	*A.baumannii*	C, P	Etats Unis, Mexique	(Higgins *et al.*, 2013)

3. Résistance acquise aux aminosides

Les aminosides sont utilisés dans le traitement d'un large éventail des infections. Leur activité dépend de la liaison à un motif hautement conservée de l'ARNr 16S. Les mécanismes de résistance aux aminosides comprennent la diminution de la perméabilité de la membrane externe, les systèmes d'efflux, les substitutions d'acides aminés au niveau des protéines ribosomales (modification de cible par méthylation), mais le mécanisme de résistance le plus fréquent est enzymatique, conduisant à une modification de la molécule (Potron *et al.*, 2015).

La présence des gènes codant pour les enzymes modifiant les aminosides sur des intégrons de classe 1 est fréquemment rapportée chez les souches multi-résistantes d'*A.baumannii*. Les principales classes des enzymes modificatrices décrites sont : aminoside acétyltransferase (AAC), aminoside nucleotidyltransférase (ANT) et aminoside phosphotransférase (APH) (Jung and Park, 2015). Ces enzymes ont également été détectées chez d'autres espèces d'*Acinetobacter* comme *A.pittii, A.nosocomialis, A.haemolyticus* et *A.johnsonii* (Espinal *et al.*, 2011).

D'autre part, il a été démontré que la méthylation de l'ARN ribosomal 16S était un autre mécanisme de résistance aux aminosides rencontré chez les bactéries à Gram négatif. Elle est médiée par des enzymes dites méthylases qui interférent avec le site d'action, ce qui contribue à un niveau de résistance élevé aux aminosides (Doi and Arakawa, 2007; Jung and Park, 2015). Parmi les différentes méthylases, ArmA a été largement rapportée chez plusieurs souches d'*A.baumannii* conférant la résistance à tous les aminosides. De telles souches ont été isolées en Chine, Corée, Vietnam, Japon, Amérique du Nord, Norvège, Italie, Bulgarie, Iran et en Algérie. Le gène *arm*A codant pour cette méthylase est associé à un transposon composite de type Tn1548 (Potron *et al.*, 2015). Outre les nombreuses études rapportant la production d'ArmA, une autre méthylase appelée RmtB a été identifiée chez des souches d'*A.baumannii* isolées auVietnam (Tada *et al.*, 2013).

Enfin, la résistance aux aminosides peut être associée à deux pompes à efflux : la pompe AdeABC appartenant à la famille RND (Resistance Nodulation- Cell Division) et la pompe AbeM appartenant à la famille MATE (Multidrug and toxic compound extrusion) (Almasaudi, 2016; Roca *et al.*, 2012).

4. Résistance acquise aux quinolones

Les quinolones ont une bonne activité contre *Acinetobacter* spp. Cependant, la résistance à ces antibiotiques a augmenté rapidement (Espinal *et al.*, 2011). Chez *A.baumanii*, l'acquisition de la résistance à cette famille d'antibiotiques est principalement liée à des mutations chromosomiques au niveau d'une région appelée « quinolone resistance determining region (QRDR), notamment dans les gènes *gyr*A et *Par*C codant les topo-isomérases, l'ADN gyrase et la topo-isomérase IV(Potron *et al.*, 2015; Roca *et al.*, 2012). La résistance plasmidique aux quinolones a été récemment mise en évidence en Chine (Jiang *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2016). Concernant les autres *Acinetobacter*, plusieurs cas de résistance aux quinolones ont été rapportés, notamment chez *A.pittii* et *A.nosocomialis* (Espinal *et al.*, 2011). D'autre part, les mutations au niveau des systèmes de régulation des pompes à efflux empêchent l'accumulation intracellulaire de l'antibiotique et constituent un autre mécanisme de résistance aux quinolones. Ainsi, la surexpression des systèmes d'efflux de type RND (AdeABC, AdeIJK) et MATE (AbeM) contribue à l'acquisition de résistance aux quinolones (Almasaudi, 2016)

5. Résistance acquise aux cyclines et à la glycylcycline

Le premier mécanisme de résistance aux cyclines décrit est celui médié par des pompes à efflux spécifiques appelés TetA et TetB qui sont codées par gènes localisés sur des transposons ou des plasmides. Le second mécanisme de résistance décrit est celui médié par le gène *tet*M qui code pour une protéine capable de protéger le ribosome contre l'effet de la tétracycline, de la minocycline et de la doxycycline. Les cyclines, et notamment la tigécycline, sont également sensibles aux systèmes d'efflux de type AdeABC et AdeIJK (Falagas *et al.*, 2015; Perez *et al.*, 2007; Potron *et al.*, 2015). Récemment, il a été rapporté qu'une mutation au niveau du gène *trm* codant pour une méthyltransférase a été associée à une diminution de la sensibilité vis-à-vis de la tigécycline chez une souche d'*A.baumannii* (Chen *et al.*, 2014).

6. Résistance acquise à la rifampicine

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

7. Résistance acquise aux polymyxines

Au cours de la dernière décennie, la polymyxine B et la polymyxine E (colistine) ont présenté un regain d'intérêt thérapeutique malgré leurs effets indésirables. En effet, suite à l'émergence des bactéries à Gram négatif hautement résistantes aux antibiotiques et le manque de nouvelles molécules sur le marché, la colistine a été de plus en plus prescrite. Ceci a eu pour conséquence une apparition puis diffusion des souches d'*A.baumannii* résistantes à la colistine (Potron *et al.*, 2015).

L'acquisition de la résistance est principalement liée à des modifications au niveau des voies de la biosynthèse du lipopolysaccharide (LPS) (Almasaudi, 2016; Potron *et al.*, 2015). Chez *A.baumannii*, deux mécanismes de résistance à la colistine ont été décrits: l'altération du lipide A, composant du LPS suite à des mutations au niveau de système de régulation à deux composantes PmrAB, et l'absence de production de LPS résultant de mutations dans les gènes *lpx*A, *lpx*C et *lpx*D qui codent pour les enzymes catalysant les premières étapes de la synthèse (Adams *et al.*, 2009; Beceiro *et al.*, 2011; Moffatt *et al.*, 2010). La résistance à la colistine est rarement rapportée chez les souches cliniques d'*A.baumannii* mais l'évaluation de la sensibilité reste difficile et n'est souvent pas précise du fait que la majorité des laboratoires n'utilisent pas la technique standard qui est la micro dilution (Hindler and Humphries, 2013). Les premières souches d'*A.baumannii* résistantes à la colistine ont été isolées en 2005 en Corée de Sud, puis plusieurs cas ont été détectés en Corée, Espagne, Iran, France et Etats Unis (Potron *et al.*, 2015). Par ailleurs, il a été rapporté récemment que le pompe à efflux EmrAB peut jouer un role dans la résistance à la colistine chez *A.baumannii* (Lin *et al.*, 2017)

XII. Options thérapeutiques

La majorité des souches d'*Acinetobacter* sont résistantes aux pénicillines, céphalosporines de 1ère et 2ème génération, macrolides, quinolones et chloramphénicol. Ainsi, les infections causées par des souches présentant un phénotype sauvage peuvent être traitées par des antibiotiques tels que : ceftazidime, cefepime, carbapénèmes, sulbactam, piperacilline/tazobactam, aminosides, fluoroquinolones seules ou en combinaison (Kim *et al.*, 2014b). Cependant, le taux de résistance a augmenté de façon considérable et des épidémies causées par des souches PDR ont été rapportées (Valencia *et al.*, 2009).

Les carbapénèmes (imipénème et méropenème) sont considérées comme le traitement de choix dans le cas des souches multi-résistantes à condition qu'elles soient sensibles à ces antibiotiques (Almasaudi, 2016). Le sulbactam, inhibiteur de ß-lactamase, a démontré *in vitro* des activités bactéricides contre *Acinetobacter* spp. En outre, l'utilité du sulbactam dans le traitement des infections dues à des souches résistantes à l'imipénème a été vérifiée par des études rétrospectives et prospectives (Almasaudi, 2016; Kim *et al.*, 2014b). Toutefois, la présence des souches résistantes au sulbactam a été rapportée (Yang *et al.*, 2010).

Du fait de l'émergence des bactéries multi-résistantes, et malgré leurs effets toxiques sur les reins, les polymixines B et E (colistine) sont de plus en plus utilisées en pratique médicale pour le traitement des infections sévères. Des études observationnelles ont montré que le taux de guérison ou d'amélioration cliniques parmi des patients traités par la colistine variait entre 57 % et 77 % (Vourli *et al.*, 2015). Dans une étude récente, il a été montré que la colistine, en combinaison avec la daptomycine ou la teicoplanine, améliorait le traitement des souches multi-résistantes d'*A.baumannii* dans un modèle murin de septicémie (Cirioni *et al.*, 2016).

La tigécycline, dérivé de minocycline, a montré des activités bactériostatiques dans des infections de peau et des tissus mou ainsi que dans des infections intra abdominales (Eckmann *et al.*, 2013; Montravers *et al.*, 2013). Cependant dans le cas des pneumonies acquises, la tigécycline a été associée à un risque accru de mortalité en comparaison avec d'autres agents antimicrobiens (Prasad *et al.*, 2012). En outre, la tigécycline pénètre rapidement dans les cellules et les tissus ce qui la rend inappropriée pour le traitement des bactériémies (Kim *et al.*, 2014b). Des souches résistantes ont été aussi détectées (Almasaudi, 2016).

XIII. Revue « Reservoirs of non *baumannii Acinetobacter* species »

Ahmad Al Atrouni[1, 2], Marie-Laure Joly-Guillou [2,3], Monzer Hamze[1,4], Marie Kempf[2,3*]

[1]Laboratoire Microbiologie Santé et Environnement (LMSE), Centre AZM pour la recherche en Biotechnologie et ses applications, Ecole Doctorale des Sciences et de Technologie, Université Libanaise, Tripoli, Liban

[2]ATOMycA, Inserm Atip-Avenir Team, CRCNA, Inserm U892, 6299 CNRS, University of Angers, France.

[3]Laboratoire de Bactériologie, Institut de Biologie en Santé – Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France.

[4] Faculté de Santé Publique, Université Libanaise, Tripoli, Liban

**** Corresponding author***

Laboratoire de Bactériologie, Institut de Biologie en Santé

Centre Hospitalier Universitaire Angers

4 rue Larrey, 49933 Angers cedex, France.

Phone : (33) 2 41 35 50 13. Fax : (33) 2 41 35 41 64

Email : makempf@chu-angers.fr

1. Introduction

En raison de son rôle important en pathologie humaine, *A.baumannii* a été largement étudiée afin d'élucider son épidémiologie extrahospitalière et détecter les modes de transmission possibles. Cependant, les autres espèces d'*Acinetobacter* sont également impliquées dans les infections. Le but de cette revue est de faire un état de lieu sur les différents réservoirs connus à ce jour des espèces d'*Acinetobacter* non *baumannii*.

frontiers in Microbiology

MINI REVIEW
published: 01 February 2016
doi: 10.3389/fmicb.2016.00049

Reservoirs of Non-*baumannii* *Acinetobacter* Species

Ahmad Al Atrouni[1,2], *Marie-Laure Joly-Guillou*[2,3], *Monzer Hamze*[1,4] and *Marie Kempf*[2,3]*

[1] Laboratoire Microbiologie Santé et Environnement, Centre AZM pour la Recherche en Biotechnologie et ses Applications, Ecole Doctorale des Sciences et de Technologie, Université Libanaise, Tripoli, Liban, [2] ATOMycA, Inserm Atip-Avenir Team, CRCNA, Inserm U892, 6299 Centre National de la Recherche Scientifique, University of Angers, Angers, Lebanon, [3] Laboratoire de Bactériologie, Institut de Biologie en Santé – Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France, [4] Faculté de Santé Publique, Université Libanaise, Tripoli, Lebanon

Acinetobacter spp. are ubiquitous gram negative and non-fermenting coccobacilli that have the ability to occupy several ecological niches including environment, animals and human. Among the different species, *Acinetobacter baumannii* has evolved as global pathogen causing wide range of infection. Since the implementation of molecular techniques, the habitat and the role of non-*baumannii Acinetobacter* in human infection have been elucidated. In addition, several new species have been described. In the present review, we summarize the recent data about the natural reservoir of non-*baumannii Acinetobacter* including the novel species that have been described for the first time from environmental sources and reported during the last years.

Keywords: *Acinetobacter* spp., non-*baumannii*, extra-hospital reservoirs, environment, humans, animals, food, novel species

OPEN ACCESS

Edited by:
John W. A. Rossen,
University of Groningen, Netherlands

Reviewed by:
Ákos Tóth,
National Center for Epidemiology, Hungary
Fiona Walsh,
National University of Ireland Maynooth, Ireland

***Correspondence:**
Marie Kempf
makempf@chu-angers.fr

Specialty section:
This article was submitted to Infectious Diseases, a section of the journal Frontiers in Microbiology

Received: *09 November 2015*
Accepted: *12 January 2016*
Published: *01 February 2016*

Citation:
Al Atrouni A, Joly-Guillou M-L, Hamze M and Kempf M (2016) Reservoirs of Non-baumannii Acinetobacter Species. Front. Microbiol. 7:49. doi: 10.3389/fmicb.2016.00049

INTRODUCTION

Implementation of molecular techniques in research laboratories has greatly improved the identification of *Acinetobacter* species. Among these techniques, 16S-rRNA, RNA polymerase subunit B (*rpoB*), and DNA gyrase subunit B (*gyrB*) gene sequencing, as well as DNA-DNA hybridization and whole genome sequencing provide good informative data for *Acinetobacter* taxonomic studies (Rafei et al., 2014; Jung and Park, 2015). Based on these methods, novel species have been reported and the genus now contains 51 species with valid published names (http://apps.szu.cz/anemec/Classification.pdf. (Accessed October, 2015).

Acinetobacter species are ubiquitous in nature and can be found in different environmental sources such as hydrocarbon contaminated areas, activated sludge, sewage, dump sites, but also on vegetables, animals, and humans (Doughari et al., 2011). The ability to dominate in so many ecological niches led thus some authors to consider these bacteria as microbial weeds (Cray et al., 2013).

Among the different species, *Acinetobacter baumannii* is the leading one. It has emerged in recent decades as a clinically relevant pathogen causing a wide range of nosocomial infections, community-acquired infections or war and natural disaster-related infections (Peleg et al., 2008). Nevertheless, the role of non-*baumannii Acinetobacter* in human infections is increasingly reported thanks to technological advances such as molecular biology that allow correct identification of the bacteria at the species level. Thus, for example, several cases concerning multidrug resistant *Acinetobacter pittii* and *Acinetobacter nosocomialis* strains that caused infections in health-care facilities have been reported around the world (Karah et al., 2011; Kouyama et al., 2012; Yang et al., 2012; Schleicher et al., 2013; Fitzpatrick et al., 2015). *Acinetobacter calcoaceticus* which is mainly an environmental species has been described in several cases of pneumonia and bacteraemia

(Mostachio et al., 2012; Li et al., 2015a), and nosocomial infections due to species like *Acinetobacter lwoffii*, *Acinetobacter junii,* or *Acinetobacter johnsonii* were also reported (Lee et al., 2007; Karah et al., 2011).

Because of its important role in human infections, *A. baumannii* has been the most studied bacterium of the *Acinetobacter* genus. In contrast, little is known on other *Acinetobacter* species. The present review aims to summarize the recent data of non-*baumannii Acinetobacter* with a focus on the natural reservoir, and including the novel species that have been described for the first time from environmental sources and reported during the last years by using molecular techniques (**Table 1**).

NATURAL HABITAT OF NON-*BAUMANNII ACINETOBACTER*

Environment

Acinetobacter spp. have for long been described from various environmental sources. In 1994, Wiedman et al. characterized for the first time *A. lwoffii, A. junii,* and *A. johnsonii* in wastewater treatment plants in Germany (Wiedmann-al-Ahmad et al., 1994). Later, Houang et al. investigated soil samples from different areas in Hong Kong and showed that approximately 37% were positive for *Acinetobacter* spp. and that among these bacteria, 27% were *A. pittii* (Houang et al., 2001). Different authors described also new *Acinetobacter* species isolated from activated sludge, sewage treatment plants and raw wastewater in Australia, Portugal, Korea and Pakistan. These species were *Acinetobacter baylyi*, *Acinetobacter bouvetii*, *Acinetobacter grimontii*, *Acinetobacter tjernbergiae*, *Acinetobacter towneri*, *Acinetobacter tandoii*, *Acinetobacter gerneri, Acinetobacter kyonggiensis, Acinetobacter rudis,* and *Acinetobacter pakistanensis* (Carr et al., 2003; Lee and Lee, 2010; Vaz-Moreira et al., 2011; Abbas et al., 2014).

In different studies performed in Korea, authors isolated new *Acinetobacter* species including *Acinetobacter marinus* and *Acinetobacter seohaensis* from seawater (Yoon et al., 2007), *Acinetobacter soli* from forest soil (Kim et al., 2008) as well as *Acinetobacter brisouii* from wetland (Anandham et al., 2010). In another study conducted on soil and artificial environmental samples in Korea, Choi et al. identified *A. calcoaceticus*, *A. nosocomialis*, *A. pittii*, *Acinetobacter* genomic species close to 13TU, *Acinetobacter parvus*, *Acinetobacter radioresistens*, *A. soli*, *A. tandoii*, *Acinetobacter bereziniae*, *Acinetobacter schindleri,* and *Acinetobacter* genomic species 15TU, showing a huge diversity of *Acinetobacter* species (Choi et al., 2012). The situation in other countries was slightly different. In Lebanon, Rafei et al. performed studies on several environmental samples to investigate the presence of *Acinetobacter* spp. They showed a prevalence of 18% and discovered that non-*baumannii Acinetobacter,* including *A. pittii* and *A. calcoaceticus* were the most frequently isolated species (Rafei et al., 2015). These findings may highlight the potential role of climatic factors that can affect prevalence of *Acinetobacter* spp. in the environment.

In India, *Acinetobacter indicus* was described for the first time in soil samples collected from hexachlorocyclohexane dump sites (Malhotra et al., 2012). *Acinetobacter kookii* was a novel species isolated from beet fields in Germany, from soil in the Netherlands and in Korea, and from sediments of fish farms in Malaysia and Thailand (Choi et al., 2013). *Acinetobacter venetianus* was a novel species isolated from seawater in Israel, oil in Italy, aquaculture ponds in Denmark and from the sea in Japan (Vaneechoutte et al., 2009). Finally, *Acinetobacter bohemicus* and *Acinetobacter albensis* were two novel species described for the first time in Czech Republic and recovered from natural ecosystems such as soil, mud and water (Krizova et al., 2014, 2015a).

Noteworthy, development of new high throughput sequencing techniques allowed metagenomics studies that could improve our understanding of bacterial microbiota surviving in different environmental sites. For example, *Acinetobacter* spp. were found in soil samples contaminated with petroleum hydrocarbons (Sarma et al., 2004; Bordenave et al., 2007; Obuekwe et al., 2009) and in sediments and water samples in Asian countries collected either from fish pond contaminated with organic waste or from fish and shrimp farms (Huys et al., 2007; Xiong et al., 2015). However, even if metagenomics can provide information on bacterial diversity, in these studies isolates were not characterized at the species level.

In the recent years, several new *Acinetobacter* species have been described in Korea and China. *Acinetobacter antiviralis* and *Acinetobacter oleivorans* were two novel species isolated from tobacco plant roots and rice paddy in Korea (Lee et al., 2009; Kang et al., 2011). In China, *Acinetobacter refrigeratoris, Acinetobacter puyangensis*, *Acinetobacter qingfengensis, Acinetobacter populi, Acinetobacter guangdongensis,* and *Acinetobacter harbinensis* were six novel species that have been isolated from a refrigerator, popular bark, abandoned lead-zinc ore mine site and surface water of a river respectively (Li et al., 2013, 2014a,b, 2015b; Feng et al., 2014a,b).

Further microbiome studies have been conducted to investigate the bacterial population in the floral nectar of some plants. Interestingly, it has been shown that *Acinetobacter* was the main bacterial taxa founded (Fridman et al., 2012; Álvarez-Pérez and Herrera, 2013). Besides, *Acinetobacter boissieri* and *Acinetobacter nectaris* were two novel species that were isolated from nectar samples of plants in Spain (Álvarez-Pérez et al., 2013).

Recently, it has been shown that the environment could constitute a potential reservoir for *Acinetobacter* spp. resistant isolates. Indeed, carbapenemase and extended-spectrum beta-lactamase producing strains have been isolated from hospital sewage, soil samples around animal farms, but also in polluted rivers (Zong and Zhang, 2013; Maravić et al., 2015; Wang and Sun, 2015; **Table 1**), highlighting the potential role of these bacteria in the dissemination of antibiotic resistance genes through the environment.

Food

Presence of *Acinetobacter* spp. in the food chain has also been studied. From 1999, Berlau et al. isolated *A. guillouiae*, *A. calcoaceticus*, *A. pittii, A. lwoffii,* and *A. bereziniae* on vegetables purchased from markets in the United Kingdom or harvested from gardens during the summer (Berlau et al., 1999a).

TABLE 1 | Natural habitat of non-*baumannii Acinetobacter* species.

Acinetobacter species	Origin of isolation	Country of isolation	Identification method	References
A. albensis	Water, soil	Czech Republic	Phenotypic, 16S-RNA, *gyrB*, *rpoB*, *gltA*, *pyrG*, *recA*, Maldi-TOF	Krizova et al., 2015a
A. anitratus	Animal	France	Phenotypic, 16S-rRNA	La Scola et al., 2001
A. antiviralis	Plant roots	Korea	% G+C, fatty acid analysis, 16S-RNA, DNA-DNA hybridization	Lee et al., 2009
A. apis	Animal	Korea	DNA-DNA hybridization, 16S rRNA gene and *rpoB* sequence analysis, % G+C, and fatty acid analysis	Kim et al., 2014
A. baylyi	Activated sludge	Australia	16S-rRNA DNA-DNA hybridization	Carr et al., 2003
A. beijerinckii	Animal	Lebanon	*rpoB*	Rafei et al., 2015
A. bereziniae	Sewage	Denmark	16S-rRNA	Geiger et al., 2009
	Life environment surface	Korea	16S-rRNA *rpoB*	Choi et al., 2012
	Vegetables	Hong Kong UK	ARDRA	Berlau et al., 1999a; Houang et al., 2001
	Meat	Lebanon	*rpoB*	Rafei et al., 2015
	Human skin	Germany Hong Kong	Phenotypic, ARDRA, SDS-PAGE, ribotyping, DNA-DNA hybridization, RAPD	Seifert et al., 1997; Chu et al., 1999
	Animal	Lebanon	*rpoB*	Rafei et al., 2015
A. bohemicus	Soil	Czech Republic	*rpoB*, *gyrB*, 16S-rRNA	Krizova et al., 2014
	Water	Czech Republic	*rpoB*, *gyrB*, 16S-rRNA	Krizova et al., 2014
A. boissieri	Floral nectar	Spain	Phenotypic, G+C, fatty acids, 16S-rRNA, *rpoB*, DNA-DNA hybridization	Álvarez-Pérez et al., 2013
A. bouvetii	Activated sludge	Australia	16S-rRNA DNA-DNA hybridization	Carr et al., 2003
A. brisouii	Wetland (Peat)	Korea	Phenotypic, G+C, fatty acids, 16S-rRNA, DNA-DNA hybridization	Anandham et al., 2010
A. calcoaceticus	Sewage, water	Denmark, Croitia	16S-rRNA	Geiger et al., 2009; Maravić et al., 2015
	Soil	Hong Kong Korea Lebanon China	ARDRA 16S-rRNA *rpoB*	Houang et al., 2001; Choi et al., 2012; Rafei et al., 2015; Wang and Sun, 2015
	Vegetables	Lebanon UK	*rpoB* ARDRA	Berlau et al., 1999a; Rafei et al., 2015; Al Atrouni et al., 2016
	Animal	Lebanon	*rpoB*	Rafei et al., 2015
	Human skin	Hong Kong India	Phenotypic, ARDRA, RAPD	Chu et al., 1999; Patil and Chopade, 2001
A. gandensis	Water	Croitia	–	Maravić et al., 2015
	Animal	–	Phenotypic, DNA-DNA hybridization, 16S rRNA *rpoB*, % G+C, fatty acid, MALDI-TOF MS	Smet et al., 2014
A. gerneri	Activated sludge	Australia	16S-rRNA DNA-DNA hybridization	Carr et al., 2003
	Animal	Lebanon	*rpoB*	Rafei et al., 2015

(Continued)

TABLE 1 | Continued

Acinetobacter species	Origin of isolation	Country of isolation	Identification method	References
A. grimontii,	Activated sludge	Australia	16S-rRNA DNA-DNA hybridization	Carr et al., 2003
A. guangdongensis	lead-zinc ore mine site	China	Phenotypic, G+C, fatty acids, 16S-rRNA, *gyrB*, *rpoB*, DNA-DNA hybridization	Feng et al., 2014b
A. guillouiae	Water	Denmark	16S-rRNA	Geiger et al., 2009
	Vegetables	UK	ARDRA	Berlau et al., 1999a
	Human skin	Hong Kong UK, Netherland	Phenotypic, ARDRA, RAPD, AFLP	Chu et al., 1999; Dijkshoorn et al., 2005
A. haemolyticus	Water	Croitia	–	Maravić et al., 2015
	Human skin	India	Phenotypic	Patil and Chopade, 2001
A. harbinensis	Water	China	Phenotypic, G+C, fatty acids, 16S-rRNA, *gyrB*, *rpoB*, DNA-DNA hybridization	Li et al., 2014b
A. indicus	Dump site	India	Phenotypic, G+C, fatty acids, 16S-rRNA, *rpoB*, DNA-DNA hybridization	Malhotra et al., 2012
A. johnsonii	Activated sludge	Germany	Pcr fingerprinting	Wiedmann-al-Ahmad et al., 1994
	Sewage, water, sea food	Denmark, Croitia, China	16S-rRNA	Geiger et al., 2009; Zong and Zhang, 2013; Maravić et al., 2015
	Animal	Lebanon	*rpoB*	Rafei et al., 2015
	Human skin	Germany Hong Kong UK, Netherland	Phenotypic, ARDRA, SDS-PAGE, ribotyping, DNA-DNA hybridization, RAPD, AFLP	Seifert et al., 1997; Chu et al., 1999; Dijkshoorn et al., 2005
A. junii	Activated sludge	Germany	Pcr fingerprinting	Wiedmann-al-Ahmad et al., 1994
	Sewage, water	Denmark, Croitia	16S-rRNA	Geiger et al., 2009; Maravić et al., 2015
	Animal	Lebanon	*rpoB*	Rafei et al., 2015
	Soil	China	ARDRA 16S-rRNA *rpoB*	Wang and Sun, 2015
	Human skin	Germany Hong Kong India UK, Netherland	Phenotypic, ARDRA, SDS-PAGE, ribotyping, DNA-DNA hybridization, RAPD, AFLP	Seifert et al., 1997; Chu et al., 1999; Patil and Chopade, 2001; Dijkshoorn et al., 2005
A. koukii	Soil, beet field, sediment	Korea, Germany, Netherland, Malaysia, Thailand	Phenotypic, G+C, fatty acids, 16S-rRNA, *gyrB*, *rpoB*, DNA-DNA hybridization	Choi et al., 2013
A. kyonggiensis	Sewage	Korea	Phenotypic, G+C, fatty acids, 16S-rRNA, DNA-DNA hybridization	Lee and Lee, 2010
A. lwoffii	Activated sludge	Germany	PCR fingerprinting	Wiedmann-al-Ahmad et al., 1994
	Sewage, water, sea food	Denmark	16S-rRNA	Geiger et al., 2009
	Life environment surface	Korea	16S-rRNA *rpoB*	Choi et al., 2012
	Animal	Lebanon, Croitia	*rpoB*, 16S-RNA	Rafei et al., 2015; Sun et al., 2015
	Vegetables	UK	ARDRA	Berlau et al., 1999a
	Human skin	Germany UK Hong Kong India	Phenotypic, ARDRA, SDS-PAGE, ribotyping, DNA-DNA hybridization, RAPD	Seifert et al., 1997; Berlau et al., 1999b; Chu et al., 1999; Patil and Chopade, 2001

(Continued)

TABLE 1 | Continued

Acinetobacter species	Origin of isolation	Country of isolation	Identification method	References
A. marinus	Water	Korea	G+C, 16S-RNA, DNA-DNA hybridization	Yoon et al., 2007
A. nectaris	Floral nectar	Spain	Phenotypic, G+C, fatty acids, 16S-rRNA, *rpoB*, DNA-DNA hybridization	Álvarez-Pérez et al., 2013
A. nosocomialis	Sewage	Denmark	16S-rRNA	Geiger et al., 2009
	Life environment surface	Korea	16S-rRNA *rpoB*	Choi et al., 2012
	Vegetables	UK	ARDRA	Berlau et al., 1999a
	Human skin	Hong Kong	ARDRA, RAPD	Chu et al., 1999
A. oleivorans	Rice paddy	Korea	% G+C, fatty acid analysis, 16S-RNA, DNA-DNA hybridization	Kang et al., 2011
A. pakistanensis	Wastewater	Pakistan	Phenotypic, fatty acids, 16S-rRNA, *gyrB*, *rpoB*, *atpD*, DNA-DNA hybridization	Abbas et al., 2014
A. parvus	Soil	Korea	16S-rRNA *rpoB*	Choi et al., 2012
	Life environment surface	Korea	16S-rRNA *rpoB*	Choi et al., 2012
A. pittii	Sewage	Denmark	16S-rRNA	Geiger et al., 2009
	Soil	Hong Kong, Lebanon	ARDRA *rpoB*	Houang et al., 2001; Rafei et al., 2015
	Vegetables	Hong Kong Lebanon UK	ARDRA *rpoB*	Berlau et al., 1999a; Houang et al., 2001; Rafei et al., 2015
	Life environment surface	Korea	16S-rRNA *rpoB*	Choi et al., 2012
	Water	Lebanon	*rpoB*	Rafei et al., 2015
	Cheese, Meat	Lebanon	*rpoB*	Rafei et al., 2015
	Animal	Lebanon	*rpoB*	Rafei et al., 2015
	Human skin	Germany Hong Kong India	Phenotypic, ARDRA, SDS-PAGE, ribotyping, DNA-DNA hybridization, RAPD	Seifert et al., 1997; Chu et al., 1999; Patil and Chopade, 2001
A. populi	Populus bark	China	Phenotypic,16S-RNA, *gyrB*, *rpoB*, DNA-DNA hybridization	Li et al., 2015b
A. puyangensis	Populus bark	China	Phenotypic, G+C, fatty acids, 16S-rRNA, *gyrB*, *rpoB*, DNA-DNA hybridization	Li et al., 2013
A. qingfengensis	Populus bark	China	Phenotypic, G+C, fatty acids, 16S-rRNA, *gyrB*, *rpoB*, DNA-DNA hybridization	Li et al., 2014a
A. radioresistens	Soil, cotton, water	Australia, Croitia		Dortet et al., 2006; Maravić et al., 2015
	Life environment surface	Korea	16S-rRNA *rpoB*	Choi et al., 2012
	Animal	Lebanon	*rpoB*	Rafei et al., 2015; Sunantaraporn et al., 2015
	Human skin	Germany UK Hong Kong	Phenotypic, ARDRA, SDS-PAGE, ribotyping, DNA-DNA hybridization, RAPD	Seifert et al., 1997; Berlau et al., 1999b; Chu et al., 1999

(Continued)

TABLE 1 | Continued

Acinetobacter species	Origin of isolation	Country of isolation	Identification method	References
A. refrigeratoris	Life environment surface	China	16S-rRNA, *rpoB* DNA-DNA hybridization	Feng et al., 2014a
A. rudis	Wastewter, raw milk	Portugal, Israel	Phenotypic, G+C, fatty acids, 16S-rRNA, *gyrB*, *rpoB*, DNA-DNA hybridization	Vaz-Moreira et al., 2011
A. seifertii/genomspecies close 13 TU	Life environment surface	Korea	16S-RNA, *rpoB*	Choi et al., 2012
	Human skin	Hong Kong	ARDRA, RAPD	Chu et al., 1999
A. seohaensis	Water	Korea	G+C, 16S-RNA, DNA-DNA hybridization	Yoon et al., 2007
A. shindleri	Life environment surface	Korea	16S-rRNA *rpoB*	Choi et al., 2012
	Animal	Lebanon	*rpoB*	Rafei et al., 2015; Sunantaraporn et al., 2015
A. soli	Soil	Korea	Phenotypic, fatty acids, G+C content, 16S-rRNA gyrB, DNA-DNA hybridization	Kim et al., 2008
	Life environment surface	Korea	16S-rRNA *rpoB*	Choi et al., 2012
	Vegetables	Lebanon	*rpoB*	Rafei et al., 2015
A. tandoii	Activated sludge plant	Australia	16S-rRNA DNA-DNA hybridization	Carr et al., 2003
	Soil	Korea	16S-rRNA *rpoB*	Choi et al., 2012
	Life environment surface	Korea	16S-rRNA *rpoB*	Choi et al., 2012
A. tjernbergiae	Activated sludge	Australia	16S-rRNA DNA-DNA hybridization	Carr et al., 2003
A. towneri	Activated sludge	Australia	16S-rRNA DNA-DNA hybridization	Carr et al., 2003
A. variabilis /(genomspecies 15TU)	Sewage, water, sea food	Denmark	16S-rRNA	Geiger et al., 2009
	Life environment surface	Korea	rpoB	Choi et al., 2012
	Human skin	Hong Kong	ARDRA, RAPD	Chu et al., 1999
	Animal	France	Phenotypic, *gyrA, gyrB, rpoB*	Poirel et al., 2012
	Animal	–	Phenotypic, *rpoB*, gyrB, Maldi-Tof, whole genome analysis	Nishimura et al., 1988
A. venetianus	Water Oil vegetables	Israel, Italy, Denmark, Hong Kong, japan	Phenotypic, DNA-DNA hybridization, AFLP, *rpoB*, ARDRA, tDNA PCR	Vaneechoutte et al., 2009
Acinetobacter spp.	Water	China Malaysia, Thailand Vietnam	16S-rRNA	Fuhs and Chen, 1975; Huys et al., 2007; Krizova et al., 2015b; Xiong et al., 2015
	Soil	France-Kuwait	16S-rRNA	Bordenave et al., 2007; Obuekwe et al., 2009
	Meat	Hong Kong	ARDRA	Houang et al., 2001

(Continued)

TABLE 1 | Continued

Acinetobacter species	Origin of isolation	Country of isolation	Identification method	References
	Fish, shrimps	Hong Kong	ARDRA	Houang et al., 2001; Huys et al., 2007
	Sediment	China Malaysia, Thailand Vietnam	16S-rRNA	Huys et al., 2007; Xiong et al., 2015
	Plants nectar	Israel, Spain	Pyrosequencing, 16S-rRNA	Fridman et al., 2012; Álvarez-Pérez and Herrera, 2013
	Milk	United states Kenya Korea	Phenotypic	Jayarao and Wang, 1999; Ndegwa et al., 2001; Nam et al., 2009; Gurung et al., 2013
	Animal	Angola	16S-rRNA	Guardabassi et al., 1999
	Human skin	Germany Hong Kong India UK, Netherland	Phenotypic, ARDRA, SDS-PAGE, ribotyping, DNA-DNA hybridization, RAPD, AFLP	Seifert et al., 1997; Chu et al., 1999; Patil and Chopade, 2001; Dijkshoorn et al., 2005
genomspecies 14 BJ	Sewage	Denmark	16S-rRNA	Geiger et al., 2009
	Human skin	Hong Kong	ARDRA, RAPD	Chu et al., 1999
A. genospecies 15 BJ	Human skin	UK Hong Kong	Phenotypic, ADRA, RAPD	Berlau et al., 1999b; Chu et al., 1999
genomspecies 16	Sewage	Denmark	16S-rRNA	Geiger et al., 2009
	Vegetables	Hong Kong	ARDRA	Houang et al., 2001
	Human skin	Hong Kong	ARDRA, RAPD	Chu et al., 1999
A. genospecies 17	Human skin	Hong Kong	ARDRA, RAPD	Chu et al., 1999
A. genospecies 13 BJ, 14 TU	Human skin	Hong Kong	ARDRA, RAPD	Chu et al., 1999

ARDRA, Amplified rDNA (Ribosomal DNA) Restriction Analysis; RAPD, Random Amplified Polymorphic DNA; AFLP, Amplified Fragment Length Polymorphism; MALDI-TOF MS, Matrix Assisted Laser Desorption Ionization—Time Of Flight Mass Spectrometry.

In a subsequent study conducted in Hong Kong on vegetables, *A. pittii* and *Acinetobacter genomic species* 10 and 16 have been found (Houang et al., 2001). Different *Acinetobacter* species have also been isolated from fish, meat, cheese and milk samples. In Lebanon, Rafei et al. reported the isolation of non-*baumannii Acinetobacter* including *A. pittii*, *A. calcoaceticus*, *A. bereziniae,* and *A. soli* from raw cow meat, raw cheese, raw cow milk and vegetable samples (Rafei et al., 2015), and more recently, they isolated a carbepenem resistant *A. calcoaceticus* from vegetables (Al Atrouni et al., 2016). *Acinetobacter* spp. have been reported in previous studies from milk samples collected from dairy herds In the United States (Jayarao and Wang, 1999) and Kenya (Ndegwa et al., 2001). The isolation rate was 1.3 and 5% respectively. *Acinetobacter* spp. have been reported also from mastitic milk and raw bulk tank milk samples in Korea (Nam et al., 2009; Gurung et al., 2013).

Animals

While several published studies reported the isolation of *A. baumannii* from animals such as ducks, pigeons, chicken, donkey, rabbits, pets (cats, dogs), mules, livestock (goats,pigs, cattle, caws), horses, lice and arthropods (Gouveia et al., 2008; Hamouda et al., 2008, 2011; Bouvresse et al., 2011; Endimiani et al., 2011; Kempf et al., 2012a,b; Belmonte et al., 2014; Rafei et al., 2015), few studies reported the isolation of non-*baumannii Acinetobacter* from animals. *Acinetobacter* genomic species 15 TU was isolated by Poirel et al. from rectal cow samples in a dairy farm in France (Poirel et al., 2012). More recently, Rafei et al. reported the isolation of *A. pittii, A. calcoaceticus, A. bereziniae, A. johnsonii, A. lwoffii, A. schindleri, A. radioresistens, A. beijerinckii, A. junii, A. gerneri, and Acinetobacter genomic species* 15 TU from animal samples in Lebanon. The strains were isolated mainly from livestocks, horses and pets (Rafei et al., 2015). Smet et al. described for the first time *Acinetobacter gandensis* from horse and cattles (Smet et al., 2014). La Scola et al. reported the detection of *A. anitratus* in lice samples collected from homeless shelters in France (La Scola et al., 2001), and recently *A. radioresistens* and *A. schindleri* were detected from head lice collected from primary school pupils in Thailand (Sunantaraporn et al., 2015). *Acinetobacter* spp. were also detected from aquatic animals (Huys et al., 2007; Geiger et al., 2009) but also in the gut of some arthropods like tsetse fly in Angola, Africa (Guardabassi et al., 1999). Besides, *Acinetobacter apis* was a novel species isolated from the intestinal tract of a honey bee in Korea (Kim et al., 2014).

Furthermore, other studies have been performed to investigate the intestinal ecosystem of fish using metagenomic approaches. As results, *Acinetobacter* was remarquably one of the most

abundant genera detected. Indeed, the ability to produce antibacterial compounds against several other species as well as environmental factors and nutrition conditions may affect the bacterial community in the fish intestine and explain the dominance of this group (Hovda et al., 2007; Etyemez and Balcázar, 2015).

Finally, recently, Sun et al. reported the isolation of NDM-1 producing *A. lwoffii* from rectal sample of a cat in China (Sun et al., 2015), suggesting that these companion animals may play a crucial role in the dissemination of multidrug resistant bacteria.

Human Carriage

Acinetobacter spp. can be part of the human flora. In a large University Hospital in Cologne, Germany, Seifert et al. performed an epidemiological study to investigate the colonization with *Acinetobacter* spp. of the skin and mucous membranes of hospitalized patients and healthy controls. They showed that the colonization rate was higher in patients than in controls (75 vs. 42.5%) (Seifert et al., 1997). The hands, the groin, toe webs, the forehead and the ears were the most frequently colonized body sites. Almost all the species isolated were non-*baumannii Acinetobacter* including *A. lwoffii* (47%), *A. johnsonii* (21%), *A. radioresistens* (12%), *A. pittii* (11%), and *A. junii* (5%). In contrast, *A. baumannii* and *A. bereziniae* were rarely detected and the authors did not find *A. calcoaceticus* or *A. haemolyticus* on the skin or the mucous membranes (Seifert et al., 1997).

Berlau et al. performed a similar study to investigate the presence of *Acinetobacter* spp. on the skin (forearm, forehead, toe web) of 192 healthy volunteers in the United Kingdom. As in the previous study, they found that the colonization rate was around 40% with *A. lwoffii* being the most frequently isolated species and the forearm being the most frequently colonized area. However, the distribution of the other species was different, *Acinetobacter* genomic species 15BJ (12%), *A. radioresistens* (8%) and only one individual carried the *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex (Berlau et al., 1999b). In another study conducted in Hong Kong, Chu et al. showed that the skin carriage rate of student nurses and new nurses from the community was 32 and 66% respectively with *A. pittii* being the most common species (Chu et al., 1999). The authors reported also a potential seasonal variability in skin colonization (Chu et al., 1999). Patil et al. studied skin carriage on six body sites (antecubital fossa, axilla, forehead with hairline, neck, outer surface of nose and toe webs) from volunteers in India. It was found that non-*baumannii Acinetobacter* were the most frequently isolated species including *A. lwoffii, A. junii, A. haemolyticus, A. calcoaceticus,* and *A. pittii*. In this study the antecubital fossa had the highest colonization frequency (48.5%) and the men volunteers were more colonized than the women (Patil and Chopade, 2001).

Likewise, *Acinetobacter* spp. have been also isolated from fecal samples. A study performed by Dijkshoorn et al. in United Kingdom and the Netherlands to investigate the intestinal carriage of *Acinetobacter* spp. showed that from 226 fecal samples collected randomly from the community 38 were positive. The species commonly isolated were: *A. johnsoni*i, *A. guillouiae,* and *A. junii* (Dijkshoorn et al., 2005).

Genomic approaches have also been used to study the bacterial community of some human samples. Thus, Zakharkina et al. reported *Acinetobacter* spp. from airway microbiota of healthy individuals (Zakharkina et al., 2013), while Urbaniak et al. reported the detection of these microorganism from human milk samples (Urbaniak et al., 2014). Recently, in another work conducted to study the microbial diversity of intestinal microbiota of healthy volunteers, Li et al. showed that *Acinetobacter* was present mainly in the duodenum (Li et al., 2015c). According to these findings, we can see the ability of *Acinetobacter* to survive in commensal samples, suggesting that human could constitute a potential reservoir for this opportunistic bacterium. However, the origin and the factors that can influence this colonization remained unclear.

GLOBAL REMARKS

Referring to these results, we showed here that the environment is the main reservoir of *Acinetobacter* spp. and interestingly the bacteria have been mainly isolated from sites in contact with human, animal or in areas polluted with hydrocarbon. Therefore, it has been suggested that *Acinetobacter* spp. belong to the small minority of species that are able to dominate within an open habitat (Cray et al., 2013). Indeed, the microorganisms are exposed in the environment to multiple factors that affect their growth and act as stress parameters such as desiccation conditions, temperature, air humidity and other parameters that are subjected to dynamic changes. Unlike some other Gram negative bacteria, *Acinetobacter* spp. are able to survive in a dry environment for long periods of time and support desiccation conditions (Wendt et al., 1997; Wagenvoort and Joosten, 2002). This tolerance may be due to different mechanisms such as over expression of proteins involved in the antimicrobial resistance, efflux pumps, down regulation of proteins involved in the cell cycle, transcription and translation in order to enter in a dormant state (Gayoso et al., 2014). Furthermore, hydrocarbons and polysaccharides are macromolecules available in the environment and may constitute a primary substrate for these microorganisms. *Acinetobacter* species can catabolize the polysaccharides *via* the production of xylanase which is a key enzyme to degrade complex extracellular substances such as hemicelluloses. It has also been shown that pollution of environmental sites either with fuel oil or metals can affect the microbial diversity and only few types of bacteria such as *Acinetobacter* spp. were able to resist and dominate such polluted areas (Bordenave et al., 2007; Zhao et al., 2014). Moreover, these bacteria are able to degrade various pollutants and organic compounds and have an important role in environmental bioremediation (Adegoke et al., 2012; Cray et al., 2013). Finally, *Acinetobacter* spp. have developed strategies to inhibit the growth of competing species either by acidification of the environment (secretion of organic acids) or by production inhibitory biosurfactants (Cray et al., 2013).

In this review, we showed also that the use of DNA based methods contribute to the progress in the field of the diversity of the genus *Acinetobacter*. As a result, a large number of well characterized species were available and *Acinetobacter* remains

an interesting model for taxonomist to study the natural diversity as well as the evolutionary history of this bacterium. In fact, recent studies suggested that climatic changes and pollution have the potential to alter the species distribution in the environment (Coelho et al., 2013). Other theories consider that evolution of species may be the direct response to climatic modifications (Hoffmann and Sgrò, 2011). These findings raise many questions whether description of new *Acinetobacter* species was the result of those ecological changes. On the other hand, there is an important question that remains unclearly answered: could these newly described *Acinetobacter* species have a potential role in human infection? In fact, several studies showed that uncommon and newly described *Acinetobacter* species such as *A. septicus* and *A. bereziniae* were involved in human infection and some of them were resistant to carbapenems (Kilic et al., 2008; Kuo et al., 2010; Sung et al., 2014). Moreover, other studies conducted in France, Croatia, Japan and China reported the detection of multidrug resistant strains of *A. schindleri*, *A. guillouiae*, *A. soli*, *A. ursingii* and *A. beijerinckii* isolated from clinical samples (Dortet et al., 2006; Bošnjak et al., 2014; Endo et al., 2014; Fu et al., 2015; Quiñones et al., 2015). Based on these results, one can presume that other species of *Acinetobacter* will be discovered soon in human infections thanks to more efficient molecular techniques used for bacterial identification.

In conclusion, even if the present data derived from only few studies, it seems that almost all of the *Acinetobacter* species are widely distributed in nature and that the contaminated environment may enhance the growth of these microorganisms. Further studies are nevertheless required to understand the behavior of *Acinetobacter* spp. and to elucidate the mode of transmission of those bacteria from these different habitats to humans.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AA, MJ, MH, and MK contributed to the conception and design of the work, and to the acquisition and interpretation of the data. All authors contributed to the drafting of the manuscript and approved the final version to be published.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by the Lebanese University and the National Council for Scientific Research in Lebanon.

REFERENCES

Abbas, S., Ahmed, I., Kudo, T., Iida, T., Ali, G. M., Fujiwara, T., et al. (2014). Heavy metal-tolerant and psychrotolerant bacterium *Acinetobacter pakistanensis* sp. nov. isolated from a textile dyeing wastewater treatment pond. *Pak. J. Agric. Sci.* 51, 593–606.

Adegoke, A. A., Mvuyo, T., and Okoh, A. I. (2012). Ubiquitous *Acinetobacter* species as beneficial commensals but gradually being emboldened with antibiotic resistance genes. *J. Basic Microbiol.* 52, 620–627. doi: 10.1002/jobm.201100323

Al Atrouni, A., Kempf, M., Eveillard, M., Rafei, R., Hamze, M., and Joly-Guillou, M-L. (2016). First report of Oxa-72 producing *Acinetobacter calcoaceticus* in Lebanon. *New Microbes. New Infect.* 9, 11–12. doi: 10.1016/j.nmni.2015.11.010

Álvarez-Pérez, S., and Herrera, C. M. (2013). Composition, richness and nonrandom assembly of culturable bacterial–microfungal communities in floral nectar of Mediterranean plants. *FEMS Microbiol. Ecol.* 83, 685–699. doi: 10.1111/1574-6941.12027

Álvarez-Pérez, S., Lievens, B., Jacquemyn, H., and Herrera, C. M. (2013). *Acinetobacter nectaris* sp. nov. and *Acinetobacter boissieri* sp. nov., isolated from floral nectar of wild Mediterranean insect-pollinated plants. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 1532–1539. doi: 10.1099/ijs.0.043489-0

Anandham, R., Weon, H.-Y., Kim, S.-J., Kim, Y.-S., Kim, B.-Y., and Kwon, S.-W. (2010). *Acinetobacter brisouii* sp. nov., isolated from a wetland in Korea. *J. Microbiol. Seoul Korea* 48, 36–39. doi: 10.1007/s12275-009-0132-8

Belmonte, O., Pailhoriès, H., Kempf, M., Gaultier, M. P., Lemarié C, Ramont, C., et al. (2014). High prevalence of closely-related *Acinetobacter baumannii* in pets according to a multicentre study in veterinary clinics, Reunion Island. *Vet. Microbiol.* 170, 446–450. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.01.042

Berlau, J., Aucken, H., Malnick, H., and Pitt, T. (1999b). Distribution of *Acinetobacter* species on skin of healthy humans. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 18, 179–183. doi: 10.1007/s100960050254

Berlau, J., Aucken, H. M., Houang, E., and Pitt, T. L. (1999a). Isolation of *Acinetobacter* spp. including *A. baumannii* from vegetables: implications for hospital-acquired infections. *J. Hosp. Infect.* 42, 201–204. doi: 10.1053/jhin.1999.0602

Bordenave, S., Goñi-Urriza, M. S., Caumette, P., and Duran, R. (2007). Effects of heavy fuel oil on the bacterial community structure of a pristine microbial mat. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 6089–6097. doi: 10.1128/AEM.01352-07

Bošnjak, Z., Plecko, V., Budimir, A., Mareković I, and Bedenić, B. (2014). First Report of, N. D.M-1-Producing *Acinetobacter guillouiae*. *Chemotherapy* 60, 250–252. doi: 10.1159/000381256

Bouvresse, S., Socolovshi, C., Berdjane, Z., Durand, R., Izri, A., Raoult, D., et al. (2011). No evidence of Bartonella quintana but detection of *Acinetobacter baumannii* in head lice from elementary schoolchildren in Paris. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 34, 475–477. doi: 10.1016/j.cimid.2011.08.007

Carr, E. L., Kämpfer, P., Patel, B. K. C., Gürtler, V., and Seviour, R. J. (2003). Seven novel species of *Acinetobacter* isolated from activated sludge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 953–963. doi: 10.1099/ijs.0.02486-0

Choi, J.-Y., Kim, Y., Ko, E. A., Park, Y. K., Jheong, W.-H., Ko, G., et al. (2012). *Acinetobacter* species isolates from a range of environments: species survey and observations of antimicrobial resistance. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 74, 177–180. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.06.023

Choi, J. Y., Ko, G., Jheong, W., Huys, G., Seifert, H., Dijkshoorn, L., et al. (2013). *Acinetobacter kookii* sp. nov., isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 4402–4406. doi: 10.1099/ijs.0.047969-0

Chu, Y. W., Leung, C. M., Houang, E. T., Ng, K. C., Leung, C. B., Leung, H. Y., et al. (1999). Skin carriage of *Acinetobacters* in Hong Kong. *J. Clin. Microbiol.* 37, 2962–2967.

Coelho, F. J. R. C., Santos, A. L., Coimbra, J., Almeida, A., Cunha, Â., Cleary, D. F. R., et al. (2013). Interactive effects of global climate change and pollution on marine microbes: the way ahead. *Ecol. Evol.* 3, 1808–1818. doi: 10.1002/ece3.565

Cray, J. A., Bell, A. N. W., Bhaganna, P., Mswaka, A. Y., Timson, D. J., and Hallsworth, J. E. (2013). The biology of habitat dominance; can microbes behave as weeds? *Microb. Biotechnol.* 6, 453–492. doi: 10.1111/1751-7915.12027

Dijkshoorn, L., van Aken, E., Shunburne, L., van der Reijden, T. J. K, Bernards, A. T., Nemec, A., et al. (2005). Prevalence of *Acinetobacter baumannii* and other *Acinetobacter* spp. in faecal samples from non-hospitalised individuals. *Clin. Microbiol. Infect.* 11, 329–332. doi: 10.1111/j.1469-0691.2005.01093.x

Dortet, L., Legrand, P., Soussy, C.-J., and Cattoir, V. (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. doi: 10.1128/JCM.01535-06

Doughari, H. J., Ndakidemi, P. A., Human, I. S., and Benade, S. (2011). The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: an overview. *Microbes Environ.* 26, 101–112. doi: 10.1264/jsme2.ME10179

Endimiani, A., Hujer, K. M., Hujer, A. M., Bertschy, I., Rossano, A., Koch, C., et al. (2011). *Acinetobacter baumannii* isolates from pets and horses in Switzerland: molecular characterization and clinical data. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 2248–2254. doi: 10.1093/jac/dkr289

Endo, S., Yano, H., Kanamori, H., Inomata, S., Aoyagi, T., Hatta, M., et al. (2014). High frequency of *Acinetobacter soli* among *Acinetobacter* isolates causing bacteremia at a tertiary hospital in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 52, 911–915. doi: 10.1128/JCM.03009-13

Etyemez, M., and Balcázar, J. L. (2015). Bacterial community structure in the intestinal ecosystem of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as revealed by pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes. *Res. Vet. Sci.* 100, 8–11. doi: 10.1016/j.rvsc.2015.03.026

Feng, G., Yang, S., Wang, Y., Yao, Q., and Zhu, H. (2014a). *Acinetobacter refrigeratoris* sp. nov., isolated from a domestic refrigerator. *Curr. Microbiol.* 69, 888–893. doi: 10.1007/s00284-014-0669-6

Feng, G.-D., Yang, S.-Z., Wang, Y.-H., Deng, M.-R., and Zhu, H.-H. (2014b). *Acinetobacter guangdongensis* sp. nov., isolated from abandoned lead-zinc ore. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 3417–3421. doi: 10.1099/ijs.0.066167-0

Fitzpatrick, M. A., Ozer, E., Bolon, M. K., and Hauser, A. R. (2015). Influence of, ACB complex genospecies on clinical outcomes in a U.S. hospital with high rates of multidrug resistance. *J. Infect.* 70, 144–152. doi: 10.1016/j.jinf.2014.09.004

Fridman, S., Izhaki, I., Gerchman, Y., and Halpern, M. (2012). Bacterial communities in floral nectar. *Environ. Microbiol. Rep.* 4, 97–104. doi: 10.1111/j.1758-2229.2011.00309.x

Fu, Y., Liu, L., Li, X., Chen, Y., Jiang, Y., Wang, Y., et al. (2015). Spread of a common blaNDM-1-carrying plasmid among diverse *Acinetobacter* species. *Infect. Genet. Evol.* 32, 30–33. doi: 10.1016/j.meegid.2015.02.020

Fuhs, G. W., and Chen, M. (1975). Microbiological basis of phosphate removal in the activated sludge process for the treatment of wastewater. *Microb. Ecol.* 2, 119–138. doi: 10.1007/BF02010434

Gayoso, C. M., Mateos, J., Méndez, J. A., Fernández-Puente, P., Rumbo, C., Tomás, M., et al. (2014). Molecular mechanisms involved in the response to desiccation stress and persistence in *Acinetobacter baumannii*. *J. Proteome Res.* 13, 460–476. doi: 10.1021/pr400603f

Geiger, A., Fardeau, M.-L., Grebaut, P., Vatunga, G., Josénando, T., Herder, S., et al. (2009). First isolation of *Enterobacter*, *Enterococcus*, and *Acinetobacter* spp. as inhabitants of the tsetse fly (*Glossina palpalis palpalis*) midgut. *Infect. Genet. Evol.* 9, 1364–1370. doi: 10.1016/j.meegid.2009.09.013

Gouveia, C., Asensi, M. D., Zahner, V., Rangel, E. F., and de Oliveira, S. M. P. (2008). Study on the bacterial midgut microbiota associated to different Brazilian populations of Lutzomyia longipalpis (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae). *Neotrop. Entomol.* 37, 597–601. doi: 10.1590/S1519-566X2008000500016

Guardabassi, L., Dalsgaard, A., and Olsen, J. E. (1999). Phenotypic characterization and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. isolated from aquatic sources. *J. Appl. Microbiol.* 87, 659–667. doi: 10.1046/j.1365-2672.1999.00905.x

Gurung, M., Nam, H. M., Tamang, M. D., Chae, M. H., Jang, G. C., Jung, S. C., et al. (2013). Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* from raw bulk tank milk in Korea. *J. Dairy Sci.* 96, 1997–2002. doi: 10.3168/jds.2012-5965

Hamouda, A., Findlay, J., Al Hassan, L., and Amyes, S. G. (2011). Epidemiology of *Acinetobacter baumannii* of animal origin. *Int. J. Antimicrob. Agents* 38, 314–318. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2011.06.007

Hamouda, A., Vali, L., and Amyes, S. G. (2008). Gram-negative non-fermenting bacteria from food-producing animals are low risk for hospital-acquired infections. *J. Chemother.* 20, 702–708. doi: 10.1179/joc.2008.20.6.702

Hoffmann, A. A., and Sgrò, C. M. (2011). Climate change and evolutionary adaptation. *Nature* 470, 479–485. doi: 10.1038/nature09670

Houang, E. T., Chu, Y. W., Leung, C. M., Chu, K. Y., Berlau, J., Ng, K. C., et al. (2001). Epidemiology and infection control implications of *Acinetobacter* spp. in Hong Kong. *J. Clin. Microbiol.* 39, 228–234. doi: 10.1128/JCM.39.1.228-234.2001

Hovda, M. B., Lunestad, B. T., Fontanillas, R., and Rosnes, J. T. (2007). Molecular characterisation of the intestinal microbiota of farmed Atlantic salmon (Salmo salar L.). *Aquaculture* 26, 581–588. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.08.045

Huys, G., Bartie, K., Cnockaert, M., Hoang Oanh, D. T., Phuong, N. T., Somsiri, T., et al. (2007). Biodiversity of chloramphenicol-resistant mesophilic heterotrophs from Southeast Asian aquaculture environments. *Res. Microbiol.* 158, 228–235. doi: 10.1016/j.resmic.2006.12.011

Jayarao, B. M., and Wang, L. (1999). A study on the prevalence of gram-negative bacteria in bulk tank milk. *J. Dairy Sci.* 82, 2620–2624. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(99)75518-9

Jung, J., and Park, W. (2015). *Acinetobacter* species as model microorganisms in environmental microbiology: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 2533–2548. doi: 10.1007/s00253-015-6439-y

Kang, Y.-S., Jung, J., Jeon, C. O., and Park, W. (2011). *Acinetobacter oleivorans* sp. nov. is capable of adhering to and growing on diesel-oil. *J. Microbiol. Seoul Korea* 49, 29–34. doi: 10.1007/s12275-011-0315-y

Karah, N., Haldorsen, B., Hegstad, K., Simonsen, G. S., Sundsfjord, A., Samuelsen, Ø., et al. (2011). Species identification and molecular characterization of *Acinetobacter* spp. blood culture isolates from Norway. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 738–744. doi: 10.1093/jac/dkq521

Kempf, M., Abdissa, A., Diatta, G., Trape, J. F., Angelakis, E., Mediannikov, O., et al. (2012b). Detection of *Acinetobacter baumannii* in human head and body lice from Ethiopia and identification of new genotypes. *Int. J. Infect. Dis.* 16, e680–e683. doi: 10.1016/j.ijid.2012.05.1024

Kempf, M., Rolain, J. M., Diatta, G., Azza, S., Samb, B., Mediannikov, O., et al. (2012a). Carbapenem resistance and *Acinetobacter baumannii* in Senegal: the paradigm of a common phenomenon in natural reservoirs. *PLoS ONE* 7:e39495. doi: 10.1371/journal.pone.0039495

Kilic, A., Li, H., Mellmann, A., Basustaoglu, A. C., Kul, M., Senses, Z., et al. (2008). *Acinetobacter septicus* sp. nov. association with a nosocomial outbreak of bacteremia in a neonatal intensive care Unit. *J. Clin. Microbiol.* 46, 902–908. doi: 10.1128/JCM.01876-07

Kim, D., Baik, K. S., Kim, M. S., Park, S. C., Kim, S. S., Rhee, M. S., et al. (2008). *Acinetobacter soli* sp. nov., isolated from forest soil. *J. Microbiol. Seoul Korea* 46, 396–401. doi: 10.1007/s12275-008-0118-y

Kim, P. S., Shin, N.-R., Kim, J. Y., Yun, J.-H., Hyun, D.-W., and Bae, J.-W. (2014). *Acinetobacter apis* sp. nov., isolated from the intestinal tract of a honey bee, Apis mellifera. *J. Microbiol. Seoul Korea* 52, 639–645. doi: 10.1007/s12275-014-4078-0

Kouyama, Y., Harada, S., Ishii, Y., Saga, T., Yoshizumi, A., Tateda, K., et al. (2012). Molecular characterization of carbapenem-non-susceptible *Acinetobacter* spp. in Japan: predominance of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal complex 92 and IMP-type metallo-β-lactamase-producing non-*baumannii Acinetobacter* species. *J. Infect. Chemother.* 18, 522–528. doi: 10.1007/s10156-012-0374-y

Krizova, L., Maixnerova, M., Sedo, O., and Nemec, A. (2014). *Acinetobacter bohemicus* sp. nov. widespread in natural soil and water ecosystems in the Czech Republic. *Syst. Appl. Microbiol.* 37, 467–473. doi: 10.1016/j.syapm.2014.07.001

Krizova, L., Maixnerova, M., Sedo, O., and Nemec, A. (2015a). *Acinetobacter albensis* sp. nov., isolated from natural soil and water ecosystems. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 857–863. doi: 10.1099/ijs.0.000028

Krizova, L., McGinnis, J., Maixnerova, M., Nemec, M., Poirel, L., Mingle, L., et al. (2015b). *Acinetobacter variabilis* sp. nov. (formerly, DNA group 15 sensu Tjernberg & Ursing), isolated from humans and animals. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 857–863. doi: 10.1099/ijs.0.000028

Kuo, S.-C., Fung, C.-P., Lee, Y.-T., Chen, C.-P., and Chen, T.-L. (2010). Bacteremia due to *Acinetobacter Genomic Species 10*. *J. Clin. Microbiol.* 48, 586–590. doi: 10.1128/JCM.01857-09

La Scola, B., Fournier, P-E, Brouqui, P., and Raoult, D. (2001). Detection and culture of *Bartonella quintana*, *Serratia marcescens*, and *Acinetobacter* spp. from decontaminated human body lice. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1707–1709. doi: 10.1128/JCM.39.5.1707-1709.2001

Lee, H.-J., and Lee, S.-S. (2010). *Acinetobacter kyonggiensis* sp. nov., a β-glucosidase-producing bacterium, isolated from sewage treatment plant. *J. Microbiol. Seoul Korea* 48, 754–759. doi: 10.1007/s12275-010-0355-8

Lee, J. H., Choi, C. H., Kang, H. Y., Lee, J. Y., Kim, J., Lee, Y. C., et al. (2007). Differences in phenotypic and genotypic traits against antimicrobial agents between *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter genomic species 13TU*. *J. Antimicrob. Chemother.* 59, 633–639. doi: 10.1093/jac/dkm007

Lee, J.-S., Lee, K. C., Kim, K. K., Hwang, I. C., Jang, C., Kim, N. G., et al. (2009). *Acinetobacter antiviralis* sp. nov., from Tobacco plant roots. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19, 250–256. doi: 10.4014/jmb.0901.083

Li, G., Yang, M., Zhou, K., Zhang, L., Tian, L., Lv, S., et al. (2015c). Diversity of duodenal and rectal microbiota in biopsy tissues and luminal contents in healthy volunteers. *J. Microbiol. Biotechnol.* 25, 1136–1145. doi: 10.4014/jmb.1412.12047

Li, P., Yang, C., Xie, J., Liu, N., Wang, H., Zhang, L., et al. (2015a). *Acinetobacter calcoaceticus* from a fatal case of pneumonia harboring blaNDM-1 on a widely distributed plasmid. *BMC Infect. Dis.* 15:131. doi: 10.1186/s12879-015-0870-7

Li, W., Zhang, D., Huang, X., and Qin, W. (2014b). *Acinetobacter harbinensis* sp. nov., isolated from river water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 1507–1513. doi: 10.1099/ijs.0.055251-0

Li, Y., Chang, J., Guo, L.-M., Wang, H.-M., Xie, S.-J., Piao, C.-G., et al. (2015b). Description of *Acinetobacter populi* sp. nov. isolated from symptomatic bark of Populus ×euramericana canker. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* doi: 10.1099/ijsem.0.000599. [Epub ahead of print].

Li, Y., He, W., Wang, T., Piao, C., Guo, L., Chang, J., et al. (2014a). *Acinetobacter qingfengensis* sp. nov., isolated from canker bark of Populus x euramericana. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 1043–1050. doi: 10.1099/ijs.0.051995-0

Li, Y., Piao, C., Ma, Y., He, W., Wang, H., Chang, J., et al. (2013). *Acinetobacter puyangensis* sp. nov., isolated from the healthy and diseased part of Populus xeuramericana canker bark. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 2963–2969. doi: 10.1099/ijs.0.047274-0

Malhotra, J., Anand, S., Jindal, S., Rajagopal, R., and Lal, R. (2012). *Acinetobacter indicus* sp. nov., isolated from a hexachlorocyclohexane dump site. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62, 2883–2890. doi: 10.1099/ijs.0.037721-0

Maravić, A., Skočibušić, M., Fredotović, Ž., Šamanić, I., Cvjetan, S., Knezović, M., et al. (2015). Urban riverine environment is a source of multidrug-resistant and ESBL-producing clinically important *Acinetobacter* spp. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* doi: 10.1007/s11356-015-5586-0. [Epub ahead of print].

Mostachio, A. K., Levin, A. S., Rizek, C., Rossi, F., Zerbini, J., and Costa, S. F. (2012). High prevalence of OXA-143 and alteration of outer membrane proteins in carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. isolates in Brazil. *Int. J. Antimicrob. Agents* 39, 396–401. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2012.01.021

Nam, H. M., Lim, S. K., Kang, H. M., Kim, J. M., Moon, J. S., Jang, K. C., et al. (2009). Prevalence and antimicrobial susceptibility of gram-negative bacteria isolated from bovine mastitis between 2003 and 2008 in Korea. *J. Dairy Sci.* 92, 2020–2026. doi: 10.3168/jds.2008-1739

Ndegwa, E. N., Mulei, C. M., and Munyua, S. J. (2001). Prevalence of microorganisms associated with udder infections in dairy goats on small-scale farms in Kenya. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 72, 97–98. doi: 10.4102/jsava.v72i2.627

Nishimura, Y., Ino, T., and Iizuka, H. (1988). *Acinetobacter radioresistens* sp. nov. isolated from cotton and soil. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38, 209–211. doi: 10.1099/00207713-38-2-209

Obuekwe, C. O., Al-Jadi, Z. K., and Al-Saleh, E. S. (2009). Hydrocarbon degradation in relation to cell-surface hydrophobicity among bacterial hydrocarbon degraders from petroleum-contaminated Kuwait desert environment. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 63, 273–279. doi: 10.1016/j.ibiod.2008.10.004

Patil, J. R., and Chopade, B. A. (2001). Distribution and *in vitro* antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* species on the skin of healthy humans. *Natl. Med. J. India* 14, 204–208.

Peleg, A. Y., Seifert, H., and Paterson, D. L. (2008). *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 21, 538–582. doi: 10.1128/CMR.00058-07

Poirel, L., Berçot, B., Millemann, Y., Bonnin, R. A., Pannaux, G., and Nordmann, P. (2012). Carbapenemase-producing *Acinetobacter* spp. in Cattle, France. *Emerging Infect. Dis.* 18, 523–525. doi: 10.3201/eid1803.111330

Quiñones, D., Carvajal, I., Perez, Y., Hart, M., Perez, J., Garcia, S., et al. (2015). High prevalence of bla, OXA-23 in *Acinetobacter* spp. and detection of bla, NDM-1 in *A. soli* in Cuba: report from National Surveillance Program (2010-2012). *New Microbes New Infect.* 7, 52–56. doi: 10.1016/j.nmni.2015.06.002

Rafei, R., Hamze, M., Pailhoriès, H., Eveillard, M., Marsollier, L., Joly-Guillou, M.-L., et al. (2015). Extra-human epidemiology of *Acinetobacter baumannii* in Lebanon. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 2359–2367. doi: 10.1128/AEM.03824-14

Rafei, R., Kempf, M., Eveillard, M., Dabboussi, F., Hamze, M., and Joly-Guillou, M.-L. (2014). Current molecular methods in epidemiological typing of *Acinetobacter baumannii*. *Future Microbiol.* 9, 1179–1194. doi: 10.2217/fmb.14.63

Sarma, P. M., Bhattacharya, D., Krishnan, S., and Lal, B. (2004). Assessment of intra-species diversity among strains of *Acinetobacter baumannii* isolated from sites contaminated with petroleum hydrocarbons. *Can. J. Microbiol.* 50, 405–414. doi: 10.1139/w04-018

Schleicher, X., Higgins, P. G., Wisplinghoff, H., Körber-Irrgang, B., Kresken, M., and Seifert, H. (2013). Molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter nosocomialis* in Germany over a 5-year period (2005-2009). *Clin. Microbiol. Infect.* 19, 737–742. doi: 10.1111/1469-0691.12026

Seifert, H., Dijkshoorn, L., Gerner-Smidt, P., Pelzer, N., Tjernberg, I., and Vaneechoutte, M. (1997). Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2819–2825.

Smet, A., Cools, P., Krizova, L., Maixnerova, M., Sedo, O., Haesebrouck, F., et al. (2014). *Acinetobacter gandensis* sp. nov. isolated from horse and cattle. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 4007–4015. doi: 10.1099/ijs.0.068791-0

Sun, Y., Ji, X., Liu, Y., Liu, Q., Guo, X., Liu, J., et al. (2015). New Delhi metallo-β-lactamase-1-producing *Acinetobacter lwoffii* of companion animal origin in China. *Indian J. Med. Microbiol.* 33, 615–617. doi: 10.4103/0255-0857.167333

Sunantaraporn, S., Sanprasert, V., Pengsakul, T., Phumee, A., Boonserm, R., Tawatsin, A., et al. (2015). Molecular survey of the head louse *Pediculus humanus* capitis in Thailand and its potential role for transmitting *Acinetobacter* spp. *Parasit. Vectors.* 8, 127. doi: 10.1186/s13071-015-0742-4

Sung, J. Y., Koo, S. H., Kim, S., and Kwon, K. C. (2014). Epidemiological characterizations of class 1 integrons from multidrug-resistant *Acinetobacter* isolates in Daejeon, Korea. *Ann. Lab. Med.* 34, 293–299. doi: 10.3343/alm.2014.34.4.293

Urbaniak, C., McMillan, A., Angelini, M., Gloor, G. B., Sumarah, M., Burton, J. P., et al. (2014). Effect of chemotherapy on the microbiota and metabolome of human milk, a case report. *Microbiome* 2:24. doi: 10.1186/2049-2618-2-24

Vaneechoutte, M., Nemec, A., Musílek, M., van der Reijden, T. J. K, van den Barselaar, M, Tjernberg, I., et al. (2009). Description of *Acinetobacter venetianus* ex Di Cello et al. 1997 sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 1376–1381. doi: 10.1099/ijs.0.003541-0

Vaz-Moreira, I., Novo, A., Hantsis-Zacharov, E., Lopes, A. R., Gomila, M., Nunes, O. C., et al. (2011). *Acinetobacter rudis* sp. nov., isolated from raw milk and raw wastewater. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 2837–2843. doi: 10.1099/ijs.0.027045-0

Wagenvoort, J. H., and Joosten, E. J. (2002). J. An outbreak *Acinetobacter baumannii* that mimics, MRSA in its environmental longevity. *J. Hosp. Infect.* 52, 226–227. doi: 10.1053/jhin.2001.1294

Wang, B., and Sun, D. (2015). Detection of, NDM-1 carbapenemase-producing *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter junii* in environmental samples from livestock farms. *J. Antimicrob. Chemother.* 70, 611–613. doi: 10.1093/jac/dku405

Wendt, C., Dietze, B., Dietz, E., and Rüden, H. (1997). Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *J. Clin. Microbiol.* 35, 1394–1397.

Wiedmann-al-Ahmad, M., Tichy, H. V., and Schön, G. (1994). Characterization of *Acinetobacter* type strains and isolates obtained from wastewater treatment plants by, PCR fingerprinting. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 4066–4071.

Xiong, W., Sun, Y., Zhang, T., Ding, X., Li, Y., Wang, M., et al. (2015). Antibiotics, antibiotic resistance genes, and bacterial community composition in fresh water aquaculture environment in China. *Microb. Ecol.* 70, 425–432. doi: 10.1007/s00248-015-0583-x

Yang, J., Chen, Y., Jia, X., Luo, Y., Song, Q., Zhao, W., et al. (2012). Dissemination and characterization of, NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* in an intensive care unit in China. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, E506–E513. doi: 10.1111/1469-0691.12035

Yoon, J.-H., Kim, I.-G., and Oh, T.-K. (2007). *Acinetobacter marinus* sp. nov. and *Acinetobacter seohaensis* sp. nov., isolated from sea water of the Yellow Sea in Korea. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17, 1743–1750.

Zakharkina, T., Heinzel, E., Koczulla, R. A., Greulich, T., Rentz, K., Pauling, J. K., et al. (2013). Analysis of the airway microbiota of healthy individuals and patients with chronic obstructive pulmonary disease by T-RFLP and clone sequencing. *PLoS ONE* 8:e68302. doi: 10.1371/journal.pone.0068302

Zhao, J., Zhao, X., Chao, L., Zhang, W., You, T., and Zhang, J. (2014). Diversity change of microbial communities responding to zinc and arsenic pollution in a river of northeastern China. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 15, 670–680. doi: 10.1631/jzus.B1400003

Zong, Z., and Zhang, X. (2013). blaNDM-1-carrying *Acinetobacter johnsonii* detected in hospital sewage. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 1007–1010. doi: 10.1093/jac/dks505

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

Copyright © 2016 Al Atrouni, Joly-Guillou, Hamze and Kempf. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

2. Commentaires

Malgré le fait que les données rapportées dans cette revue sont limitées à quelques études, il semble que la majorité des espèces du genre *Acinetobacter* sont largement distribuées dans différentes niches écologiques notamment l'environnement. Ainsi, l'utilisation des techniques moléculaires a permis d'identifier plusieurs espèces d'*Acinetobacter* dans les prélèvements des sols, eaux de source, eaux usées et contaminés par des hydrocarbures. En effet, divers facteurs favorisent la survie de ces bactéries dans ces milieux : la résistance à la dessiccation, l'état de dormance, le catabolisme des polysaccharides et des substances organiques, l'inhibition de la croissance des autres bactéries…. Cependant, les prévalences étaient différentes selon les pays, ce qui peut être selon certaines théories le résultat des changements climatiques et des modifications biochimiques. Par ailleurs, la réalisation des études taxonomiques avancées a permis de décrire plusieurs nouvelles espèces à partir des sites environnementaux (Tableau 1).

D'autre part, les *Acinetobacter* non *baumannii* ont été également détectés dans certains produits alimentaires surtout les végétaux et le lait, mais aussi chez les animaux en état de portage y compris ceux d'élevage et de compagnie. De même, ces derniers ont été un réservoir d'une nouvelle espèce ainsi que des souches multi-résistantes. Finalement, ces bactéries ont été capables de coloniser de façon asymptomatique la peau et les voies intestinales de l'homme.

.

Partie expérimentale

I. Epidémiologie hospitalière d'*Acinetobacter* spp

1. Introduction

A.baumannii est une bactérie opportuniste fréquemment associée aux infections communautaires et nosocomiales, particulièrement chez les sujets gravement malades dans les services de soins intensifs. Associé à des taux élevés de mortalité et de morbidité, le traitement de ces infections devient de plus en plus difficile du fait de l'émergence de la résistance aux antibiotiques. En outre, les épidémies à *A.baumannii* sont bien documentées dans la littérature et sont généralement dues à des souches multi-résistantes dont la prévalence a augmenté de façon considérable dans le monde entier au cours de ces dernières décennies. Une meilleure connaissance de la nature de ces épidémies nécessite le développement des techniques moléculaires pertinentes pour le typage des souches épidémiques. En effet, ces outils peuvent fournir des informations utiles pour la surveillance épidémiologique des infections, la différenciation rapide entre les souches apparentées, l'identification des voies potentielles de transmission, la mise en place des mesures efficaces pour le contrôle des épidémies, ainsi que l'étude des populations bactériennes.

Plusieurs techniques de typage avec différents degrés de résolution ont été proposées pour la caractérisation des épidémies à *A.baumannii.* L'électrophorèse en champ pulsé et la MLST sont les plus utilisées et sont considérées comme les méthodes de référence pour les études de clonalité à petite échelle et les études des structures des populations à large échelle. Le plus souvent, les épidémies hospitalières sont dues aux clones internationaux I, II, et III. Toutefois, l'émergence des autres clones épidémiques a aussi été documentée. Au Liban, Rafei *et al.* ont analysé 116 souches d'*A.baumannii* collectées entre 2011 et 2013 dans des hôpitaux localisés à Tripoli, en utilisant la technique *bla*$_{\text{OXA-51}}$ based sequence typing. Les mécanismes de résistance aux carbapénèmes ont également été déterminés. Les auteurs ont montré que l'OXA-66 était le variant prépondérant, détecté chez 73 souches. Le typage par MLST d'un groupe de souches a montré la prédominance de souches appartenant au clone international II.

Par ailleurs, l'amélioration des techniques d'identification des *Acinetobacter* et leur introduction dans les laboratoires de routine a permis de mettre en évidence l'implication et le rôle des autres espèces du genre dans les infections humaines. Ainsi, plusieurs cas d'infections dues à des *Acinetobacter* non *baumannii* multi-résistantes ont été mondialement rapportés.

Dans la première étude de ce chapitre, nous avons collecté 119 souches d'*A.baumannii* isolées entre 2013 et 2015 dans différents hôpitaux à Beyrouth et Tripoli, au Nord du Liban. Le premier objectif de ce travail a été d'investiguer la prévalence des souches résistantes aux carbapénèmes et de déterminer les mécanismes qui en sont responsables. Dans un second temps, la structure de la population ainsi que la parenté génétique ont été étudiées dans le but de surveiller l'évolution et la clonalité de ces souches isolées.

Dans la deuxième étude, nous décrivons deux souches d'*A.pittii* résistantes aux carbapénèmes qui ont été isolées chez des patients libanais admis dans deux hôpitaux situés dans la région de Tripoli, Nord du Liban.

2. Article 1: Widespread of OXA-23 producing carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* belonging to the clonal complex II in different hospitals in Lebanon

Ahmad Al Atrouni[1, 2], Monzer Hamze[1] , Tamima Jisr[3] , Carole Lemarié[4], Matthieu Eveillard[2,4], Marie-Laure Joly-Guillou[2,4], Marie Kempf[2, 4*]

[1]Laboratoire Microbiologie Santé et Environnement (LMSE), Ecole Doctorale des Sciences et de Technologie et Faculté de Santé Publique, Université Libanaise, Tripoli, Liban

[2]ATOMycA, InsermAtip-Avenir Team, CRCNA, Inserm U892, 6299 CNRS, University of Angers, France.

[3]Department of Clinical Laboratory, Makassed General Hospital, Beirut, Lebanon

[4]Laboratoire de Bactériologie, Institut de Biologie en Santé – Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France.

**** Corresponding author***

Laboratoire de Bactériologie, Institut de Biologie en Santé

Centre Hospitalier Universitaire Angers

4 rue Larrey

49933 Angers cedex, France.

Phone: (33) 2 41 35 50 13. Fax: (33) 2 41 35 41 64

Email: makempf@chu-angers.fr

International Journal of Infectious Diseases 52 (2016) 29–36

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Infectious Diseases

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijid

Wide spread of OXA-23-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* belonging to clonal complex II in different hospitals in Lebanon

Ahmad Al Atrouni [a,b], Monzer Hamze [a], Tamima Jisr [c], Carole Lemarié [d], Matthieu Eveillard [b,d], Marie-Laure Joly-Guillou [b,d], Marie Kempf [b,d,*]

[a] *Laboratoire Microbiologie Santé et Environnement (LMSE), Ecole Doctorale des Sciences et de Technologie et Faculté de Santé Publique, Université Libanaise, Tripoli, Lebanon*
[b] *ATOMycA, InsermAtip-Avenir Team, CRCNA, Inserm U892, 6299 CNRS, University of Angers, Angers, France*
[c] *Department of Clinical Laboratory, Makassed General Hospital, Beirut, Lebanon*
[d] *Laboratoire de Bactériologie, Institut de Biologie en Santé – Centre Hospitalier Universitaire Angers, 4 rue Larrey, 49933 Angers cedex, France*

ARTICLE INFO

Article history:
Received 16 August 2016
Accepted 15 September 2016

Corresponding Editor: Eskild Petersen, Aarhus, Denmark.

Keywords:
Acinetobacter baumannii
Carbapenem resistance
OXA-23
Clonal complex II
Lebanon

SUMMARY

Objectives: To investigate the molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* strains isolated from different hospitals in Lebanon.
Methods: A total of 119 non-duplicate Acinetobacter strains were identified using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and partial *rpoB* gene sequencing. Antibiotic susceptibility testing was performed by disc diffusion method and all identified carbapenem-resistant isolates were investigated by PCR assays for the presence of the carbapenemase-encoding genes. Multilocus sequence typing (MLST) and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) were used for molecular typing.
Results: Of the 119 *A. baumannii* isolates, 76.5% were resistant to carbapenems. The most common carbapenemase was the OXA-23-type, found in 82 isolates. The study of population structure using MLST revealed the presence of 30 sequence types (STs) including 18 new ones, with ST2 being the most commonly detected, accounting for 61% of the isolates typed. PFGE performed on all strains of ST2 identified a major cluster of 53 isolates, in addition to three other minor clusters and ten unique profiles.
Conclusions: This study highlights the wide dissemination of highly related OXA-23-producing carbapenem-resistant *A. baumannii* belonging to the international clone II in Lebanon. Thus, appropriate infection control measures are recommended in order to control the geographical spread of this clone in this country.
© 2016 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of International Society for Infectious Diseases. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

1. Introduction

Acinetobacter baumannii is one of the most common opportunistic Gram-negative bacteria associated with community-acquired infections, outbreaks, and nosocomial infections, particularly in critically ill patients. This bacterium is involved in respiratory tract infections, bloodstream infections, skin and soft tissue infections, urinary tract infections, and meningitis, leading to increased rates of mortality and morbidity.[1,2]

Infections caused by *A. baumannii* are an increasing threat in many countries. Indeed, this bacterium has a strong ability to resist desiccation and to survive on inanimate surfaces. Moreover, the prevalence of multidrug-resistant (MDR) isolates has increased worldwide in recent decades,[3,4] due to its ability to develop multidrug resistance through either the acquisition of genetic determinants such as plasmids, integrons, and transposons, or through the acquisition of mutations leading to the modification of antibiotic targets, efflux pump expression, and membrane permeability.[5] As a consequence, the treatment of infections caused by such isolates has become more and more difficult, even with most clinically available drugs, including tigecycline, colistin, and carbapenems.[1,4,6]

* Corresponding author. Tel.: +33 2 41 35 50 13; fax: +33 2 41 35 41 64.
E-mail address: makempf@chu-angers.fr (M. Kempf).

http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2016.09.017
1201-9712/© 2016 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of International Society for Infectious Diseases. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

A recent retrospective nationwide study conducted by the Lebanese Society of Infectious Diseases showed that the percentage of resistance to imipenem among *Acinetobacter spp* increased significantly from 57.6% in 2011 to 84.5% in 2013.[7] In *A. baumannii*, carbapenem resistance was mostly associated with the production of carbapenem-hydrolyzing class D β-lactamases (CHDLs), including OXA-23, OXA-24, OXA-58, OXA-143, and OXA-235, in addition to carbapenemases from classes B and A.[6]

Nowadays, understanding the molecular characteristics of epidemic strains is the key strategy to track outbreaks and to control the spread of *A. baumannii*, both in hospitals and in the community.[8,9] Several molecular typing methods have been developed for this purpose. Among them, pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and multilocus sequence typing (MLST) have been the most frequently used and have represented the gold standard methods to investigate strain clonality and the bacterial population structure, respectively.[10] Molecular epidemiological studies have revealed *A. baumannii* outbreaks to have been caused mainly by MDR strains belonging to the international clonal complexes CC1, CC2, and CC3.[8,11] In Lebanon, previous studies have reported the predominance of carbapenem-resistant *A. baumannii* strains belonging to the international clone II .[12,13]

The main objectives of this work were to investigate the prevalence of carbapenem-resistant *A. baumannii* isolates (CRAb) circulating in some Lebanese hospitals between 2013 and 2015, and to characterize the common resistance mechanisms. The population structure, as well as the genetic relatedness of CRAb isolates, was also studied in order to track the evolution and the clonality of these strains.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strain collection and identification

A total of 119 non-replicate *A. baumannii* clinical isolates were analyzed. These strains were collected between October 2013 and December 2015 from the following hospitals in Lebanon: Tripoli Governmental Hospital (TGH; 100 beds), Nini Hospital (NH; 120 beds), Makassed General Hospital (MGH; 150 beds), Saydet Zgharta Hospital (SZH; 149 beds), Hanane Hospital (HH; 45 beds), Al Youssef Medical Centre (YMC; 100 beds), Seblin Governmental Hospital (SGH; 70 beds), and Dar Ajaza Hospital (DAH; 580 beds). Isolates were sent to the Laboratory of Microbiology Health and Environment (LMSE), Tripoli, Lebanon, and were stored at −80 °C. Bacterial identification was performed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) using the Vitek MS (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), and confirmed at the species level by partial RNA polymerase β-subunit (*rpoB*) gene sequencing, as described previously.[13] For each isolate, information on the sex and age of the patient, the clinical specimen, and the type of ward were provided.

2.2. Antibiotic susceptibility testing and investigation of carbapenem resistance mechanisms

Antibiotic susceptibility testing was performed by disc diffusion method according to the recommendations of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (http://www.eucast.org). A panel of 14 antibiotics was tested, including ticarcillin, ticarcillin–clavulanic acid, piperacillin–tazobactam, ceftazidime, imipenem, ciprofloxacin, amikacin, gentamicin, tobramycin, trimethoprim–sulfamethoxazole, colistin, doxycycline, tigecycline, and rifampicin. Carbapenem resistance was confirmed by determining minimum inhibitory concentration (MICs) against imipenem and meropenem by Etest strips (bioMérieux).

Carbapenem-resistant isolates were investigated by PCR assays for the presence of the carbapenemase-encoding genes $bla_{\text{OXA-23-like}}$, $bla_{\text{OXA-24-like}}$, $bla_{\text{OXA-58-like}}$, $bla_{\text{OXA-143}}$, bla_{NDM}, bla_{IMP}, and bla_{VIM}.[12] Sequencing of the entire gene was performed on all New Delhi metallo-β-lactamase (NDM)-positive isolates.

2.3. Epidemiological typing

2.3.1. Multilocus sequence typing (MLST)

MLST was performed according to the Pasteur scheme (http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Abaumannii.html). The internal fragments of seven housekeeping genes (*fusA*, *pyrG*, *rpoB*, *rplB*, *cpn60*, *gltA*, and *recA*) were amplified, then purified and sequenced using an ABI 3130XL DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The allelic number and sequence types (STs) were analyzed using the *A. baumannii* MLST database. New STs were submitted and assigned by the Institut Pasteur MLST database. The clustering of related STs (defined as clonal complexes, CCs) was analyzed using eBURST software (http://eburst.mlst.net). A CC is defined as a set of similar ST(s) having six identical loci among seven, so a CC is formed by the founder ST and its single locus variants (SLV).

2.3.2. Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)

A. baumannii DNA was digested with *Apa*I (TaKaRa, Dalian, Liaoning Province, China) as a restriction enzyme. DNA fragments were separated on 1% w/v agarose gels in 0.5× Tris/borate/ethylenediaminetetraacetic acid (TBE) buffer at 14 °C using a CHEF DRII apparatus (Bio-Rad) with 6 V/cm, pulsed from 3 to 20 s for 21 h; gels were stained with Gel Red. The Dice coefficient was used to calculate similarities, and the unweighted pair group method using average linkages (UPGMA) was used for cluster analysis with fingerprinting II software (Bio-Rad, Marne La Coquette, France). Isolates were considered to belong to the same PFGE clone if their Dice similarity index was ≥80%.

3. Results

3.1. Bacterial strain collection and identification

The 119 isolates analyzed in this study were collected from seven hospitals situated in different regions in Lebanon: North of Lebanon, Beirut, and Mount of Lebanon. Forty-eight isolates were from Tripoli Governmental Hospital (Tripoli, North of Lebanon), 40 from Nini Hospital (Tripoli, North of Lebanon), 21 from Makassed General Hospital (Beirut), four from Saydet Zgharta Hospital (Zgharta, North of Lebanon), two from each of Hanane Hospital (Tripoli, North of Lebanon) and Al Youssef Medical Centre (Akkar, North of Lebanon), and one from each of Dar Ajaza (Beirut) and Seblin Governmental Hospital (Seblin, Mount of Lebanon). The isolates were mostly recovered from the respiratory tract (n = 35; 29%) and skin and soft tissue (n = 33; 28%), followed by urine (n = 14; 12%), blood (n = 9; 7.6%), and vascular catheters (n = 6; 5%). Of note, 19 (13.4%) patients were asymptomatically colonized (Table 1).

3.2. Antibiotic susceptibility testing and investigation of carbapenem resistance mechanisms

Antibiotic susceptibility testing showed that the *A. baumannii* isolates analyzed were MDR. Indeed, most of them were resistant to β-lactams, aminoglycosides, ciprofloxacin, and doxycycline. However, only four isolates were resistant to rifampicin and one isolate to tigecycline, while colistin and tigecycline maintained their activity against all isolates. Among the isolates, 91 (76.5%) showed an imipenem-resistant phenotype. Etest results confirmed

Table 1
Characteristics of *Acinetobacter baumannii* isolates

Strain ID	Sex	Age, years	Origin	Year of study	City	Hospital	Department	Carbapenem phenotype[a]	Resistance genes	ST	CC[b]
1	M	NA	Tracheal aspirate	2013	Tripoli	TGH	ICU	S	-	698	S
2	F	65	Rectal swab	2013	Tripoli	NH	ICU	R	OXA-23	2	2
3	F	76	Tracheal aspirate	2013	Tripoli	NH	ICU	R	OXA-23	2	2
4	M	18	Wound	2013	Tripoli	TGH	IM	R	OXA-23	2	
5	F	NA	Broncho-tracheal lavage	2013	Tripoli	TGH	IM	R	OXA-23	2	2
6	M	NA	Wound	2013	Tripoli	TGH	IM	R	OXA-23	2	2
7	M	66	Tracheal aspirate	2013	Tripoli	TGH	IM	R	OXA-23	2	2
8	M	NA	Wound	2013	Tripoli	TGH	IM	R	OXA-23	2	2
9	M	45	Catheter	2013	Tripoli	HH	NA	R	OXA-23	2	
10	F	81	Rectal swab	2014	Tripoli	NH	ICU	R	OXA-23	2	2
11	F	39	Wound	2014	Tripoli	TGH	IM	R	OXA-23	2	2
12	M	NA	Broncho-tracheal lavage	2014	Tripoli	TGH	ICU	R	OXA-23	2	2
13	M	NA	Blood	2014	Tripoli	TGH	IM	R	NDM-1	85	85
14	M	82	Rectal swab	2014	Tripoli	NH	IM	S	-	600	2
15	F	NA	NA	2014	Tripoli	HH	NA	R	OXA-23	2	2
16	F	86	Tracheal aspirate	2014	Tripoli	NH	ICU	R	OXA-23	2	2
19	F	23	Urine	2014	Tripoli	NH	OP	S	-	701	S
20	F	84	Nasal swab	2014	Tripoli	NH	ICU	R	OXA-23	2	2
21	M	21	Wound	2014	Tripoli	TGH	IM	R	OXA-23	2	2
22	F	NA	Sputum	2014	Tripoli	TGH	ICU	R	OXA-23/OXA-24	2	2
23	M	60	NA	2014	Zgharta	SZH	NA	S	-	2	2
24	M	NA	Blood	2014	Tripoli	TGH	ICU	S	-	702	S
26	F	NA	Wound	2014	Tripoli	TGH	IM	R	OXA-23	2	2
27	M	83	Rectal swab	2014	Tripoli	NH	IM	S	-	2	2
28	M	NA	Sputum	2014	Tripoli	TGH	ICU	R	OXA-23	2	2
29	F	38	Urine	2014	Tripoli	NH	OP	S	-	704	S
30	F	NA	Catheter	2014	Tripoli	TGH	ICU	S	-	702	S
33	M	NA	Sputum	2014	Tripoli	TGH	ICU	S	-	702	S
34	F	78	Urine	2014	Tripoli	NH	NA	S	-	46	S
35	M	NA	NA	2014	Zgharta	SZH	NA	R	OXA-23	705	S
36	M	NA	Sputum	2014	Tripoli	TGH	NA	S	-	702	S
38	M	44	Tracheal aspirate	2014	Tripoli	NH	ICU	R	OXA-23	2	2
39	M	NA	Broncho-tracheal lavage	2014	Tripoli	TGH	IM	R	OXA-23	2	2
40	M	84	Urine	2014	Tripoli	NH	IM	S	-	2	2
43	M	27	Rectal swab	2014	Tripoli	NH	ICU	S	-	25	25
44	M	NA	Wound	2014	Tripoli	TGH	IM	R	OXA-143	2	2
45	F	60	Wound	2014	Tripoli	TGH	ICU	R	OXA-23	2	2
46	M	NA	Wound	2014	Tripoli	TGH	IM	R	OXA-23	2	2
47	M	NA	Wound	2014	Tripoli	TGH	IM	R	OXA-23	2	2
48	F	NA	Wound	2014	Tripoli	TGH	IM	R	OXA-23	2	2
50	M	NA	Sputum	2014	Tripoli	TGH	ICU	R	OXA-23	2	2
51	M	NA	Blood	2014	Tripoli	TGH	ICU	R	OXA-23	2	2
53	M	65	Rectal swab	2014	Tripoli	TGH	ICU	S	-	52	S
54	F	NA	Wound	2014	Tripoli	TGH	OP	S	-	690	S
55	M	81	Bed swab	2014	Seblin	SGH	ICU	R	OXA-23	706	S
56	M	77	Wound	2014	Tripoli	NH	ICU	S	-	25	25
58	M	NA	Wound	2014	Tripoli	TGH	IM	R	OXA-23	2	2
59	F	NA	Urine	2014	Tripoli	TGH	IM	R	OXA-23/OXA-24	2	2
60	M	47	Pus	2014	Tripoli	NH	OP	S	-	1	1
61	M	82	Sputum	2014	Zgharta	SZH	NA	R	OXA-23	2	2
62	M	23	Wound	2014	Tripoli	TGH	IM	R	OXA-23	2	2
63	M	64	LCR	2014	Tripoli	NH	ICU	S	-	25	25
64	F	NA	Wound	2014	Tripoli	TGH	IM	R	OXA-23	2	2
65	F	69	Tracheal aspirate	2015	Tripoli	NH	ICU	R	OXA-23	2	2
66	F	NA	Wound	2015	Tripoli	TGH	ICU	R	NDM-1	85	85
67	M	75	Pus	2015	Tripoli	NH	ICU	R	OXA-23	707	S
68	M	NA	Pus	2015	Tripoli	TGH	IM	R	NDM-1	708	S
69	M	75	Nasal swab	2015	Tripoli	TGH	ICU	R	OXA-23/OXA-58	2	2
70	M	75	Rectal swab	2015	Tripoli	NH	ICU	R	OXA-23	2	2
71	NA	NA	Pus	2015	Zgharta	SZH	NA	R	OXA-23	2	2
72	F	18	Catheter	2015	Tripoli	NH	ICU	R	OXA-23	2	2
73	M	84	Rectal swab	2015	Tripoli	NH	ICU	R	OXA-23	2	2
74	M	75	Nasal swab	2015	Tripoli	NH	ICU	R	OXA-23	2	2
75	F	18	Tracheal aspirate	2015	Tripoli	NH	ICU	R	OXA-23	2	2
76	M	82	Rectal swab	2015	Tripoli	NH	ICU	S	-	2	2
77	F	69	Axillary swab	2015	Tripoli	NH	ICU	R	OXA-23	2	2
78	F	63	Urine	2015	Tripoli	NH	ICU	S	-	807	S
79	M	84	Urine	2015	Tripoli	NH	ICU	S	-	25	25
80	M	NA	Catheter	2015	Tripoli	NH	ICU	S	-	25	25
81	F	78	Urine	2015	Beirut	DAH	IM	R	OXA-23/OXA-24	2	2
82	M	NA	Blood	2015	Tripoli	TGH	ICU	S	-	424	33
83	M	NA	Tracheal aspirate	2015	Tripoli	TGH	ICU	R	NDM-1	708	S
84	M	70	Blood	2014	Beirut	MGH	IM	R	OXA-23	2	2
85	M	64	Tracheal aspirate	2014	Beirut	MGH	IM	R	OXA-23	2	2
86	M	66	Tracheal aspirate	2015	Beirut	MGH	IM	R	OXA-23	2	2

Table 1 (*Continued*)

Strain ID	Sex	Age, years	Origin	Year of study	City	Hospital	Department	Carbapenem phenotype[a]	Resistance genes	ST	CC[b]
87	M	82	Tracheal aspirate	2014	Beirut	MGH	ICU	R	OXA-23/OXA-24	711	S
88	F	81	Tracheal aspirate	2015	Beirut	MGH	IM	R	OXA-23	2	2
89	M	83	Tracheal aspirate	2015	Beirut	MGH	IM	R	OXA-23	2	2
90	F	83	Pus	2015	Beirut	MGH	IM	R	OXA-23	570	2
91	F	87	Blood	2015	Beirut	MGH	IM	R	OXA-23/OXA-24	715	S
92	M	19	Tracheal aspirate	2015	Beirut	MGH	ICU	R	OXA-23	570	2
93	F	67	Blood	2015	Beirut	MGH	CCU	R	OXA-23	570	2
94	M	58	Tracheal aspirate	2015	Beirut	MGH	CCU	R	OXA-23	600	2
95	M	26	Tracheal aspirate	2014	Beirut	MGH	IM	R	OXA-23	2	2
96	F	71	Tracheal aspirate	2015	Beirut	MGH	SURG	R	OXA-23	570	2
97	M	63	Tracheal aspirate	2015	Beirut	MGH	IM	R	OXA-23	2	2
98	M	31	Pus	2015	Beirut	MGH	IM	R	OXA-23	2	2
99	M	79	Sputum	2015	Beirut	MGH	CCU	R	OXA-23	2	2
100	F	47	Sputum	2015	Beirut	MGH	IM	R	OXA-23	713	2
101	F	74	Tracheal aspirate	2015	Beirut	MGH	IM	R	OXA-23	2	2
102	F	84	Blood	2015	Beirut	MGH	CCU	R	OXA-23/OXA-24	714	S
103	F	84	Tracheal aspirate	2015	Beirut	MGH	ICU	R	OXA-23	2	2
104	F	93	Tracheal aspirate	2015	Beirut	MGH	ICU	R	OXA-23	600	2
105	F	50	Urine	2015	Tripoli	NH	IM	S	-	808	S
106	M	42	Pus	2015	Tripoli	NH	IM	R	OXA-23	1	1
107	M	NA	Wound	2015	Tripoli	TGH	IM	R	OXA-23	85	85
108	M	NA	Wound	2015	Tripoli	TGH	IM	R	OXA-24	636	S
109	M	74	Rectal swab	2015	Tripoli	NH	ICU	R	OXA-23	2	2
110	M	65	Wound	2015	Akkar	YMC	NA	R	OXA-23	2	2
111	M	55	Urine	2015	Tripoli	NH	IM	R	OXA-23	2	2
112	F	NA	Catheter	2015	Tripoli	TGH	IM	S	-	193	S
113	F	38	Wound	2015	Tripoli	TGH	IM	R	OXA-23	2	2
114	F	NA	Pus	2015	Tripoli	TGH	ICU	R	OXA-23	2	2
115	F	NA	Catheter	2015	Tripoli	TGH	ICU	R	OXA-23	2	2
116	M	5	Urine	2015	Tripoli	NH	OP	S	-	809	S
117	F	19	Urine	2015	Tripoli	NH	OP	S	-	810	S
118	M	NA	Urine	2015	Akkar	YMC	NA	S	-	811	S
119	M	80	Wound	2015	Tripoli	NH	OP	R	OXA-23	2	2
120	F	NA	Broncho-tracheal lavage	2015	Tripoli	TGH	IM	R	OXA-23	2	2
121	F	71	Rectal swab	2015	Tripoli	NH	CCU	R	OXA-23	2	2
122	M	NA	Wound	2015	Tripoli	TGH	IM	R	OXA-23	2	2
123	F	NA	Broncho-tracheal lavage	2015	Tripoli	TGH	ICU	R	OXA-24	2	2
124	F	32	Blood	2015	Tripoli	NH	ICU	R	OXA-23	2	2
125	M	NA	Broncho-tracheal lavage	2015	Tripoli	TGH	ICU	R	OXA-23	2	2
126	F	75	Pus	2015	Tripoli	NH	P	R	OXA-23	2	2
127	M	46	Catheter	2015	Tripoli	NH	ICU	R	OXA-23	2	2
128	M	46	Nasal swab	2015	Tripoli	NH	ICU	R	OXA-23	25	25
129	F	NA	Wound	2015	Tripoli	TGH	NA	R	OXA-23	2	2
130	M	NA	Urine	2015	Tripoli	TGH	IM	R	OXA-24	812	S

CC, clonal complex; CCU, cardiac care unit; DAH, Dar Ajar Hospital; F, female; HH, Hanane Hospital; ICU, intensive care unit; IM, internal medicine; CSF, cerebrospinal fluid; M, male; MGH, Makassed General Hospital; NA, not assigned; NH, Nini Hospital; OP, outpatient; P, paediatric; SGH, Seblin Governmental Hospital; ST, sequence type; SURG, surgery; SZH, Sayedt Zgharta Hospital; TGH, Tripoli Governmental Hospital; YMC, Al Youssef Medical Centre.

[a] Phenotype: 'R' resistant or 'S' susceptible to carbapenems.

[b] S: singleton.

carbapenem resistance since the MICs for imipenem and meropenem were >32 mg/l. Carbapenemase determinants were detected in all carbapenem-resistant isolates. $bla_{\text{OXA-23-like}}$ was the most common gene found ($n = 76$; 83.5%). Furthermore, three $bla_{\text{OXA-24-like}}$ and four $bla_{\text{NDM-1}}$ were detected. Of note, six isolates carried both $bla_{\text{OXA-23-like}}$ and $bla_{\text{OXA-24-like}}$ genes and one isolate carried both $bla_{\text{OXA-23-like}}$ and $bla_{\text{OXA-58-like}}$ genes. Finally, $bla_{\text{OXA-143-like}}$ was found in one isolate.

3.3. Epidemiological typing

3.3.1. Multilocus sequence typing

MLST was performed on all isolates. As a result, 30 STs including 18 new ones were identified in this study. ST2 was the most commonly observed (73/119 isolates), accounting for 61% of the isolates typed. Other less common STs were ST25 (six isolates) and ST570 (four isolates), followed by ST85, ST600 (both with three isolates) and ST1 (two isolates). The remaining STs were found sporadically in this collection (Table 1). Based on eBURST analysis, ST2 as well as ST570, ST600, and ST713 (which are SLVs of ST2) belonged to CC2, while ST706 was a double locus variant (DLV) of ST2. Furthermore, ST1, ST25, ST85, and ST424 (a SLV of ST33) belonged to CC1, CC25, CC85, and CC33, respectively. ST690 was a DLV of CC25, and ST193 and ST702 were DLVs of CC33. Finally, ST46 was a SLV of ST622, and ST715 was a SLV of ST636. The remaining STs were singletons, since they did not share any homology with a known ST in the database (Fig. 1).

3.3.2. PFGE analysis

Based on the above MLST results, all strains of ST2 were selected for PFGE typing in order to investigate their clonality. Overall, 73 strains were analyzed. As shown in Fig. 2, PFGE revealed the presence of four clusters with two or more isolates and 10 unique profiles. The major cluster (cluster C) comprised 52 carbapenem-resistant isolates harbouring the $bla_{\text{OXA-23-like}}$ gene with or without either the $bla_{\text{OXA-24-like}}$ gene or the $bla_{\text{OXA-58-like}}$ gene, as well as one

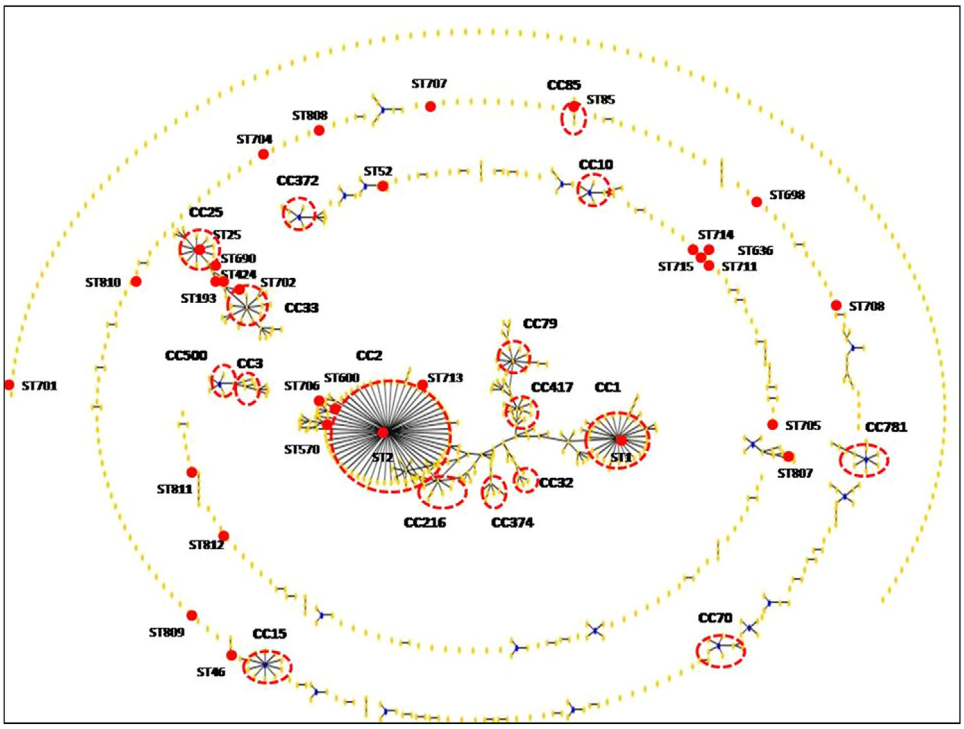


Fig. 1. Population snapshot analysed by eBURST on 836 sequences present in the MLST Pasteur database (05/05/2016). Red points and circles show sequence types identified in this study and the most important clonal complexes, respectively.

carbapenem-susceptible strain (strain 23). Interestingly, some of these strains displayed identical PFGE patterns, although they were isolated from different hospitals in different locations, mainly in Tripoli (40 isolates), Beirut (nine isolates), Zgharta (three isolates), and Akkar (one isolate). The second cluster (cluster A) contained five isolates producing the $bla_{\text{OXA-23-like}}$ gene that were recovered from two distinct hospitals in Tripoli (Table 1). Furthermore, the OXA-23-producing isolates (numbers 5, 85, and 103) that were isolated in Tripoli (TGH) and Beirut (MGH) belonged to cluster B. Finally, cluster D contained two carbapenem-resistant strains harbouring the $bla_{\text{OXA-23-like}}$ gene isolated from the same hospital (NH).

4. Discussion

A. baumannii is the most common opportunistic pathogen causing nosocomial infections, particularly respiratory tract infections in intensive care units among critically ill patients.[14] Nowadays, the excessive use of antimicrobial agents in and outside hospitals may be an important cause of the isolation of MDR *A. baumannii* strains around the world.[15–18] The major problem is that infections caused by such isolates are associated with greater morbidity and greater healthcare costs.[19,20]

The current survey was conducted in different hospitals distributed across the country, with isolates mostly being recovered from two main hospitals in Tripoli, North of Lebanon and one main hospital in Beirut. A total of 119 *A. baumannii* clinical strains were included in this study to evaluate antibiotic resistance phenotypes and molecular epidemiological features. These strains were isolated from nosocomial infections, but also from infections present at the time of admission to the hospitals, and a number of patients were only colonized.

Antibiotic susceptibility testing showed a very serious situation. Of all *A. baumannii* isolates, 76.5% were carbapenem-resistant. This rate is higher than those reported in other countries such as China, Saudi Arabia, Greece, Italy, and the USA, where reported rates were 29.4%, 69%, 57.4%, 45.7% and 34% respectively.[9,14,21–23] Interestingly, in previous studies in Lebanon, the rate of CRAb isolates was significantly different.[13,24] Moreover, 60.5% of the isolates presented here were resistant to aminoglycosides and 87% were resistant to fluoroquinolone, while tigecycline and colistin maintained their activity against all isolates.

The $bla_{\text{OXA-23}}$ gene is considered a significant cause of carbapenem resistance in *A. baumannii* worldwide.[25] This study revealed that carbapenem resistance in *A. baumannii* was also mainly associated with this gene. The present findings are similar to those reported previously from Lebanon and other countries.[13,22,26–28] Additionally, the co-occurrence of two OXA-type genes has also been reported in *A. baumannii*.[22,29] In the present study, the coexistence of either $bla_{\text{OXA-23}}$ and $bla_{\text{OXA-24}}$ or $bla_{\text{OXA-23}}$ and $bla_{\text{OXA-58}}$ was found in seven isolates. Moreover, the first description of a $bla_{\text{OXA-143-like}}$ strain is reported here, which was isolated in 2014 from a wound sample of a female patient admitted to TGH. Alarmingly, since the first description in Lebanon of a $bla_{\text{NDM-1}}$-positive *A. baumannii* [30] and *Acinetobacter pittii*,[31] four more isolates were found in this study.

Epidemiological tools are important to track outbreaks and to investigate strain relatedness in order to control the spread of MDR isolates. The evolutionary history and the dynamic spread of *A. baumannii* in this study were investigated by MLST. The data revealed that CC2 (ST2, ST570, ST600, ST713) was the main clonal complex found in Lebanon over recent years. Interestingly, almost all of these isolates were resistant to carbapenems, which is in agreement with previous studies that have used MLST for epidemiological characterization of *A. baumannii*.[8,12,21,32,33] In Lebanon, even if different clones and STs have been described, CC2 and particularly ST2 appear to be widely distributed. The capacity for biofilm formation, adherence to abiotic surfaces, and acquisition of antimicrobial resistance determinants could be the main factors that enhance the spread and the persistence of this CC in the hospital setting, as has been described previously.[34] Moreover, CC1 and CC25 have also been responsible for several

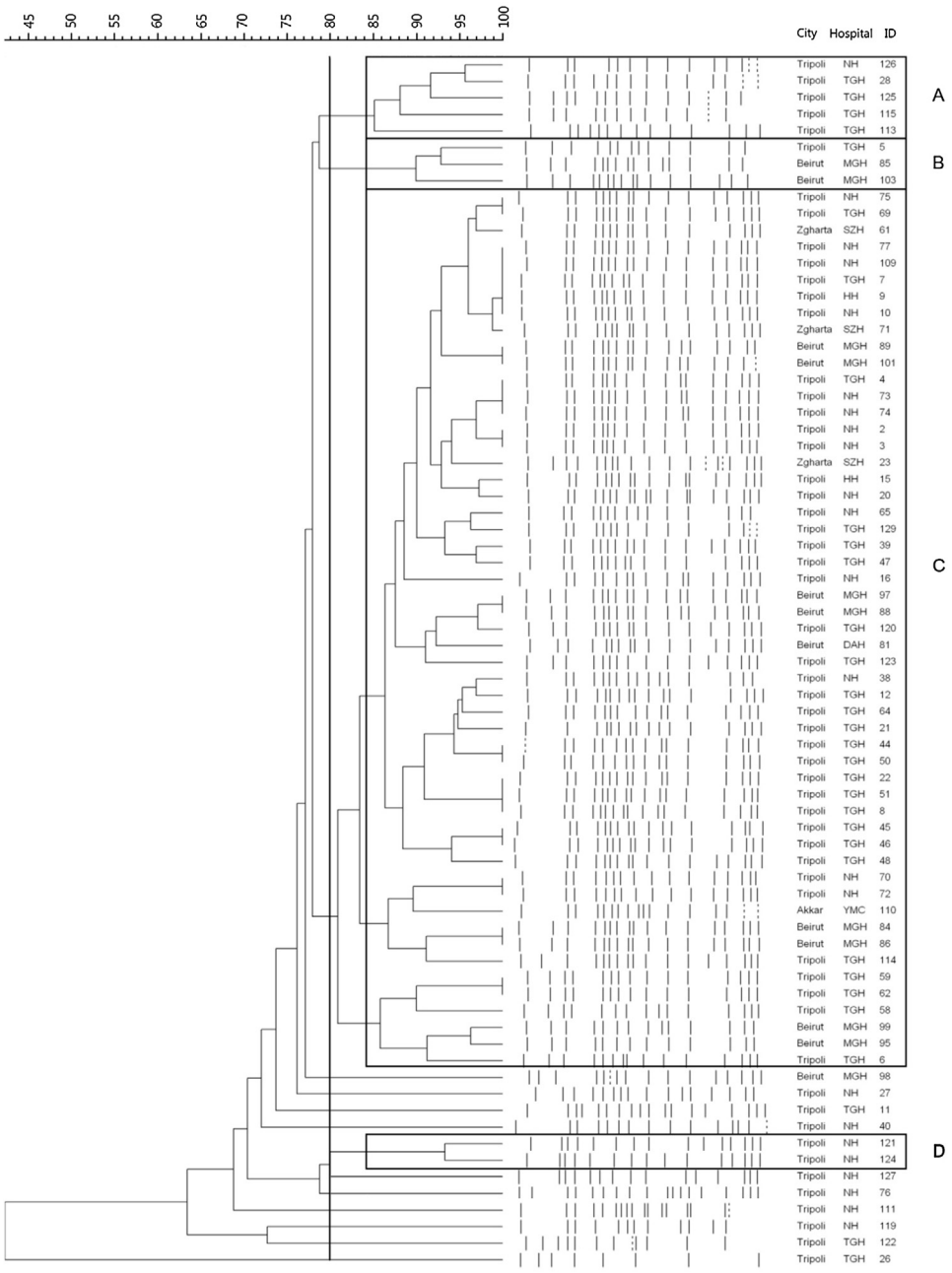


Fig. 2. Dendrogram illustrating the PFGE patterns of *Acinetobacter baumannii* isolates.

outbreaks of *A. baumannii* worldwide and have been described as emerging clones.[8,32,35] Strains belonging to these clones were detected in the present study. However, these strains, with the exception of one isolate (ST25), were all susceptible to carbapenems, which is not consistent with the results of Rafei et al., who found only carbapenem-resistant strains belonging to CC1 and CC25 in Lebanon.[13] These findings may highlight the potential role of hospitals as reservoirs for carbapenem resistance genes. Another new emerging clone, ST85 (CC85), which has long been associated with NDM-1,[13,36,37] was also detected in three isolates. Among them, two were NDM-1-producers and the remaining isolate was an OXA-23-producer. Of note, the detection of several new STs may support and highlight the continuous clonal evolution of *A. baumannii*. This diversity may be due to several mechanisms, such as mutations or the transfer and mobilization of genetic elements including insertion sequences.[38]

As shown in Table 1, 73 strains belonging to ST2 were further selected for PFGE typing. Around 72.6% (n = 53) of them belonged to the same PFGE cluster, which appeared to be a predominant clone in Lebanon. Noteworthy, among this clone, several strains sharing identical PFGE patterns were detected, although they were not isolated in the same hospital or in the same location, such as strains 69, 71, and 75 (Fig. 2). This finding may suggest a possible inter-hospital transmission of these carbapenem-resistant strains. On the other hand, the presence of identical strains in the same hospital (Fig. 2) may also highlight the existence of pseudo outbreaks. Thus, early surveillance is warranted and the development of appropriate infection control measures (environmental and equipment cleaning and disinfection, implementation of a hand hygiene programme for healthcare workers, isolation of patients with MDR *A. baumannii*, early screening of the hospitalized patients, genotyping of the isolated strains, etc.) is recommended in order to eradicate the geographical spread of this clone.

MLST approaches have been used widely for the genotyping of *A. baumannii* due to their reproducibility and portability, facilitating comparisons between laboratories. Although MLST is an expensive typing method, it provides good information on the molecular epidemiology across different hospitals and locations.[10,39] Even if it is not suitable for inter-laboratory comparison, PFGE allows the investigation of outbreaks due to its high discriminatory power. PFGE analysis showed that the majority of the isolates belonging to ST2 were highly related, which is in agreement with the findings of previous studies.[12,39] However, it is recommended that both techniques are used when testing a high number of strains isolated from different locations at different time points.

Finally, although the clinical isolates collected may be limited, these data provide a global view on the molecular epidemiology of CRAb circulating in Beirut and the North of Lebanon during recent years. Of note, *A. baumannii* has evolved as a global pathogen causing community-acquired infections and war and natural disaster-related infections.[40] Thus, there is no doubt that the overall epidemiology of *A. baumannii* in Lebanon could be highly influenced by the Syrian War, since several wounded Syrian refugees have been hosted in different Lebanese cities and admitted to different Lebanese hospitals.[13] Therefore, further research is needed including more strains from other hospitals situated in different governorates in order to ensure the continuous surveillance of these MDR organisms in Lebanon.

In conclusion, this study provides evidence of the wide dissemination of OXA-23-producing carbapenem-resistant *A. baumannii* belonging to international clone II in Lebanon. Although PFGE results did not always correlate with MLST, both techniques remain nevertheless useful for the investigation of the molecular epidemiology and clonal spread of *A. baumannii*.

Acknowledgements

We thank the team of the Institute Pasteur MLST system (Paris, France) for importing novel alleles, profiles, and isolates at http://www.pasteur.fr/mlst. We are very grateful to the clinical laboratory departments at all hospitals for their collaboration in this study. The authors gratefully thank Catherine Quinqueneau, Catherine Ramont, Maryam Yehya, Taha Abdo, Majd Mouzawak, Marianne Ekko, Aicha Borghol, and Rola Hajjar for their excellent technical assistance.

Funding: This work was supported in part by the Lebanese University and the National Council for Scientific Research, Lebanon.

Conflict of interest: We have no conflicts of interest.

References

1. Kempf M, Rolain JM. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. *Int J Antimicrob Agents* 2012;**39**:105–14.
2. McConnell MJ, Actis L, Pachón J. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiol Rev* 2013;**37**:130–55.
3. Reddy T, Chopra T, Marchaim D, Pogue JM, Alangaden G, Salimnia H, et al. Trends in antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumannii* isolates from a metropolitan Detroit health system. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;**54**:2235–8.
4. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012;**18**:268–81.
5. Imperi F, Antunes LC, Blom J, Villa L, Iacono M, Visca P, et al. The genomics of *Acinetobacter baumannii*: insights into genome plasticity, antimicrobial resistance and pathogenicity. *IUBMB Life* 2011;**63**:1068–74.
6. Potron A, Poirel L, Nordmann P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Int J Antimicrob Agents* 2015;**45**(6):568–85.
7. Chamoun K, Farah M, Araj G, Daoud Z, Moghnieh R, Salameh P, et al. Surveillance of antimicrobial resistance in Lebanese hospitals: retrospective nationwide compiled data. *Int J Infect Dis* 2016;**46**:64–70.
8. Zarrilli R, Pournaras S, Giannouli M, Tsakris A. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. *Int J Antimicrob Agents* 2013;**41**:11–9.
9. Ying J, Lu J, Zong L, Li A, Pan R, Cheng C, et al. Molecular epidemiology and characterization of genotypic analysis of *Acinetobacter baumannii* strains isolates from south China. *Jpn J Infect Dis* 2015;**69**(3):180–5.
10. Rafei R, Kempf M, Eveillard M, Dabboussi F, Hamze M, Joly-Guillou ML. Current molecular methods in epidemiological typing of *Acinetobacter baumannii*. *Future Microbiol* 2014;**9**:1179–94.
11. Diancourt L, Passet V, Nemec A, Dijkshoorn L, Brisse S. The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PLoS One* 2010;**5**:e10034.
12. Rafei R, Dabboussi F, Hamze M, Eveillard M, Lemarié C, Gaultier MP, et al. Molecular analysis of *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Lebanon using four different typing methods. *PLoS One* 2014;**9**:e115969.
13. Rafei R, Pailhoriès H, Hamze M, Eveillard M, Mallat H, Dabboussi F, et al. Molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* in different hospitals in Tripoli, Lebanon using blaOXA-51-like sequence based typing. *BMC Microbiol* 2015;**15**:103.
14. Gogou V, Pournaras S, Giannouli M, Voulgari E, Piperaki ET, Zarrilli R, et al. Evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages: a 10 year study in Greece (2000-09). *J Antimicrob Chemother* 2011;**66**:2767–72.
15. Talbot GH, Bradley J, Edwards JE, Gilbert D, Scheld M, Bartlett JG, et al. Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2006;**42**:657–68.
16. Maragakis LL, Tucker MG, Miller RG, Carroll KC, Perl TM. Incidence and prevalence of multidrug-resistant Acinetobacter using targeted active surveillance cultures. *JAMA* 2008;**299**:2513–4.
17. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009;**48**:1–12.
18. Dizbay M, Tunccan OG, Sezer BE, Hizel K. Nosocomial imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections: epidemiology and risk factors. *Scand J Infect Dis* 2010;**42**:741–6.
19. Doi Y, Husain S, Potoski BA, McCurry KR, Paterson DL. Extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis* 2009;**15**:980–2.
20. Metan G, Sariguzel F, Sumerkan B. Factors influencing survival in patients with multi-drug-resistant Acinetobacter bacteraemia. *Eur J Intern Med* 2009;**20**:540–4.
21. Al-Sultan AA, Evans BA, Aboulmagd E, Al-Qahtani AA, Bohol MF, Al-Ahdal MN, et al. Dissemination of multiple carbapenem-resistant clones of *Acinetobacter baumannii* in the Eastern District of Saudi Arabia. *Front Microbiol* 2015;**6**:634.
22. Principe L, Piazza A, Giani T, Bracco S, Caltagirone MS, Arena F, et al. Epidemic diffusion of OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* isolates in Italy: results of the first cross-sectional countrywide survey. *J Clin Microbiol* 2014;**52**:3004–10.
23. Kallen AJ, Srinivasan A. Current epidemiology of multidrug-resistant Gram-negative bacilli in the United States. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2010;**31**(Suppl 1):S51–4.
24. Hammoudi D, Moubareck CA, Hakime N, Houmani M, Barakat A, Najjar Z, et al. Spread of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* co-expressing OXA-23 and GES-11 carbapenemases in Lebanon. *Int J Infect Dis* 2015;**36**:56–61.
25. Luo TL, Rickard AH, Srinivasan U, Kaye KS, Foxman B. Association of blaOXA-23 and bap with the persistence of *Acinetobacter baumannii* within a major healthcare system. *Front Microbiol* 2015;**6**:182.
26. Fouad M, Attia AS, Tawakkol WM, Hashem AM. Emergence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* harboring the OXA-23 carbapenemase in intensive care units of Egyptian hospitals. *Int J Infect Dis* 2013;**17**:e1252–4.
27. Zowawi HM, Sartor AL, Sidjabat HE, Balkhy HH, Walsh TR, Al Johani SM, et al. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in the Gulf Cooperation Council States: dominance of OXA-23-type producers. *J Clin Microbiol* 2015;**53**:896–903.
28. Merino M, Poza M, Roca I, Barba MJ, Sousa MD, Vila J, et al. Nosocomial outbreak of a multiresistant *Acinetobacter baumannii* expressing OXA-23 carbapenemase in Spain. *Microb Drug Resist* 2014;**20**:259–63.
29. Salimizand H, Noori N, Meshkat Z, Ghazvini K, Amel SJ. Prevalence of *Acinetobacter baumannii* harboring ISAba1/bla OXA-23-like family in a burn center. *Burns J Int Soc Burn Inj* 2015;**41**:1100–6.
30. Rafei R, Dabboussi F, Hamze M, Eveillard M, Lemarié C, Mallat H, et al. First report of blaNDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* isolated in Lebanon from civilians wounded during the Syrian war. *Int J Infect Dis* 2014;**21**:21–3.
31. Al Atrouni A, Joly-Guillou ML, Hamze M, Kempf M. Emergence of NDM-1 and OXA-72 producing *Acinetobacter pittii* clinical isolates in Lebanon. *New Microbes New Infect* 2016;**12**:43–4.
32. Karah N, Sundsfjord A, Towner K, Samuelsen Ø. Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii*. *Drug Resist Updat* 2012;**15**:237–47.
33. Huber CA, Sartor AL, McOdimba F, Shah R, Shivachi P, Sidjabat HE, et al. Outbreaks of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in a Kenyan teaching hospital. *J Glob Antimicrob Resist* 2014;**2**:190–3.
34. Giannouli M, Antunes LC, Marchetti V, Triassi M, Visca P, Zarrilli R. Virulence-related traits of epidemic *Acinetobacter baumannii* strains belonging to the

international clonal lineages I–III and to the emerging genotypes ST25 and ST78. *BMC Infect Dis* 2013;**13**:282.
35. Villalón P, Valdezate S, Medina-Pascual MJ, Rubio V, Vindel A, Saez-Nieto JA. Clonal diversity of nosocomial epidemic *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Spain. *J Clin Microbiol* 2011;**49**:875–82.
36. Decousser JW, Jansen C, Nordmann P, Emirian A, Bonnin RA, Anais L, et al. Outbreak of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in France, January to May 2013. *Euro Surveill* 2013;**18**(31). pii: 20547.
37. Heydari F, Mammina C, Koksal F. NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* ST85 now in Turkey, including one isolate from a Syrian refugee. *J Med Microbiol* 2015;**64**:1027–9.
38. Wright MS, Haft DH, Harkins DM, Perez F, Hujer KM, Bajaksouzian S, et al. New insights into dissemination and variation of the health care-associated pathogen *Acinetobacter baumannii* from genomic analysis. *mBio* 2014;**5**. e00963-e00913.
39. El-Shazly S, Dashti A, Vali L, Bolaris M, Ibrahim AS. Molecular epidemiology and characterization of multiple drug-resistant (MDR) clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Int J Infect Dis* 2015;**41**:42–9.
40. O'Shea MK. Acinetobacter in modern warfare. *Int J Antimicrob Agents* 2012;**39**:363–75.

3. Article 2: Emergence of NDM-1 and OXA-72 producing *Acinetobacter pittii* clinical isolates in Lebanon

Ahmad Al Atrouni[1, 2], Marie-Laure Joly-Guillou [2,3], Monzer Hamze[1, 4], Marie Kempf[2, 3]*

[1]Laboratoire Microbiologie Santé et Environnement (LMSE), Centre AZM pour la recherche en Biotechnologie et ses applications, Ecole Doctorale des Sciences et de Technologie, Université Libanaise, Tripoli, Liban

[2]ATOMycA, Inserm Atip-Avenir Team, CRCNA, Inserm U892, 6299 CNRS, University of Angers, France.

[3]Laboratoire de Bactériologie, Institut de Biologie en Santé – Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France.

[4]Faculté de Santé Publique, Université Libanaise, Tripoli, Liban

**** Corresponding author***

Laboratoire de Bactériologie, Institut de Biologie en Santé

Centre Hospitalier Universitaire Angers

4 rue Larrey

49933 Angers cedex, France.

Phone: (33) 2 41 35 50 13. Fax: (33) 2 41 35 41 64

Email: makempf@chu-angers.fr

Emergence of NDM-1 and OXA-72 producing *Acinetobacter pittii* clinical isolates in Lebanon

A. Al Atrouni[1,2], M.-L. Joly-Guillou[2,3], M. Hamze[1] and M. Kempf[2,3]

1) *Laboratoire Microbiologie Santé et Environnement (LMSE), Ecole Doctorale des Sciences et de Technologie et Faculté de Santé Publique, Université Libanaise, Tripoli, Liban,* 2) *ATOMycA, Inserm Atip-Avenir Team, CRCNA, Inserm U892, 6299 CNRS, University of Angers and* 3) *Laboratoire de Bactériologie,Institut de Biologie en Santé – Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France*

Abstract

Acinetobacter spp. have emerged as global opportunistic pathogen causing a wide range of infections. Emergence of carbapenem resistance in these organisms is a matter of great concern. We report here the first detection of *Acinetobacter pittii* clinical isolates in Lebanon carrying either the bla_{NDM-1} or the bla_{OXA-72} gene.

© 2016 The Author(s). Published by Elsevier Ltd on behalf of European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Keywords: *Acinetobacter pittii*, bla_{NDM-1}, bla_{Oxa-72}, carbapenem resistance, Lebanon
Original Submission: 2 March 2016; **Accepted:** 14 April 2016
Article published online: 22 April 2016

Corresponding author: M. Kempf, Laboratoire de Bactériologie, Institut de Biologie en Santé, Centre Hospitalier Universitaire Angers, 4 rue Larrey, 49933 Angers cedex, France
E-mail: makempf@chu-angers.fr

The genus *Acinetobacter* comprises to date more than 50 species, among which *Acinetobacter baumannii* is the most clinically relevant, often associated with pneumonia, septicaemia, urinary tract infections, wound infections and meningitis [1]. Treatment of infections caused by this opportunistic bacterium is a challenge as a result of its strong ability to develop resistance to a wide range of antimicrobial agents, especially carbapenems. This resistance trait is mainly related to production of acquired carbapenem-hydrolyzing class D β-lactamases and metallo-β-lactamases [2]. In the last decades, the role of non-*baumannii Acinetobacter* in human infections has been increasingly recognized as a result of advances in molecular biology [3]. There are several reports of multidrug-resistant strains of *Acinetobacter pittii* and *Acinetobacter nosocomialis* in healthcare facilities around the world [4].

This study was initiated by the isolation of two imipenem-resistant *A. pittii* strains recovered in two hospitals in Tripoli, North Lebanon, in 2015. The first one, designated CMUL332, was isolated from the urine of a 4-month-old child who was admitted to the intensive care unit for fever and nephritic syndrome. The second one, CMUL334, was isolated from the urine of a 15-year-old girl patient hospitalized with febrile gastroenteritis. Bacterial identification was performed by matrix-assisted desorption ionization–time of flight mass spectrometry and partial *rpo*B gene sequencing [5]. Antimicrobial susceptibility was determined by the disk diffusion method according to the recommendations of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (http://www.eucast.org). Both isolates were resistant to ticarcillin, ticarcillin/clavulanate and ceftazidime and were of intermediate susceptibility to piperacillin/tazobactam. In contrast, they remained susceptible to aminosides, tigecycline, rifampin, ciprofloxacin and colistin, except strain CMUL332, which was resistant to tobramycin and netilmicin. The Etest method confirmed the carbapenem-resistant phenotype because the minimum inhibitory concentration for meropenem was >32 mg/L and for imipenem either >32 mg/L (CMUL332) or 16 mg/L (CMUL334). Screening of $bla_{OXA-23-like}$, $bla_{OXA-24-like}$, $bla_{OXA-58-like}$ and bla_{NDM} genes by real-time PCR revealed that CMUL332 harboured the bla_{NDM} gene, while CMUL334 carried the $bla_{OXA-24\ like}$ gene. Sequencing of the entire carbapanemase

© 2016 The Author(s). Published by Elsevier Ltd on behalf of European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)
http://dx.doi.org/10.1016/j.nmni.2016.04.005

genes showed that they encoded for NDM-1 and OXA-72 variants, respectively.

OXA-72-producing *A. pittii* was first described in Colombia in 2012 from a catheter tip–positive culture of a patient who had ischaemic hepatitis and multiorgan failure [6]. This enzyme has subsequently been reported from carbapenem-resistant clinical isolates of *A. pittii* in France [7]. On the other hand, identification of NDM-positive non-*baumannii Acinetobacter* is now increasingly reported worldwide, concomitantly with those of *A. baumannii* isolates. Indeed, recent studies have demonstrated the emergence and the dissemination of NDM-1-producing *A. pittii* in several countries, including China [4,8], Turkey [9] and recently Brazil [10].

This study is the first report of *A. pittii* producing OXA-72 and NDM-1 in Lebanon, which highlights the clinical relevance of this bacterium, in accordance with a series of recent studies [3]. Therefore, surveillance is warranted, and early detection of carbapenemase genes is recommended to avoid their major spread to more clinically relevant bacterial species.

Acknowledgements

This work was supported by the Lebanese University and the National Council for Scientific Research, Lebanon. The authors thank T. Abdou, M. Yehya, M. Akko and A. Borghol for their technical assistance.

Conflict of Interest

None declared.

References

[1] Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev 2008;21:538–82.
[2] Kempf M, Rolain JM. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. Int J Antimicrob Agents 2012;39:105–14.
[3] Al Atrouni A, Joly-Guillou ML, Hamze M, Kempf M. Reservoirs of non-*baumannii Acinetobacter* species. Front Microbiol 2016;7:49.
[4] Zhang R, Hu YY, Yang XF, Gu DX, Zhou HW, Hu QF, et al. Emergence of NDM-producing non-*baumannii Acinetobacter* spp. isolated from China. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2014;33:853–60.
[5] Gundi VA, Dijkshoorn L, Burignat S, Raoult D, La Scola B. Validation of partial *rpo*B gene sequence analysis for the identification of clinically important and emerging *Acinetobacter* species. Microbiology 2009;155:2333–41.
[6] Montealegre MC, Maya JJ, Correa A, Espinal P, Mojica MF, Ruiz SJ, et al. First identification of OXA-72 carbapenemase from *Acinetobacter pittii* in Colombia. Antimicrob Agents Chemother 2012;56:3996–8.
[7] Bonnin RA, Docobo-Pérez F, Poirel L, Villegas MV, Nordmann P. Emergence of OXA-72-producing *Acinetobacter pittii* clinical isolates. Int J Antimicrob Agents 2014;43:195–6.
[8] Yang J, Chen Y, Jia X, Luo Y, Song Q, Zhao W, et al. Dissemination and characterization of NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* in an intensive care unit in China. Clin Microbiol Infect 2012;18:E506–13.
[9] Roca I, Mosqueda N, Altun B, Espinal P, Akova M, Vila J. Molecular characterization of NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* isolated from Turkey in 2006. J Antimicrob Chemother 2014;69:3437–8.
[10] Pagano M, Poirel L, Martins AF, Rozales FP, Zavascki AP, Barth AL, et al. Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* in Brazil. Int J Antimicrob Agents 2015;45:444–5.

© 2016 The Author(s). Published by Elsevier Ltd on behalf of European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, *NMNI*, **12**, 43–44
This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

4. Commentaires

Malgré le fait que les isolats cliniques collectés étaient en nombre limité, la première étude a apporté des données importantes et une vue globale sur l'épidémiologie moléculaire d'*A.baumannii* circulant à Beyrouth et au nord du Liban au cours des dernières années. Au total, 119 souches cliniques ont été incluses dans cette étude, dont la majorité a été isolée de deux principaux hôpitaux à Tripoli, Nord du Liban (n=88) et d'un hôpital principal à Beyrouth (n=21). Ces souches ont été isolées de divers échantillons y compris des prélèvements respiratoires, de sang, des urines, et des plaies. Les résultats de la sensibilité aux antibiotiques ont montré que 76.5 % des souches étaient résistantes aux carbapénèmes. La production de l'enzyme OXA-23 était le mécanisme de résistance le plus impliqué, mais d'autres mécanismes ont été également détectés. D'autre part, 60.5 % et 87% des souches étaient résistantes aux aminosides et à la fluoroquinolone (ciprofloxacin) respectivement.

L'évolution et la structure de la population a été étudiée par MLST. L'analyse des données a montré que le CC2 ou le clone international II était le complexe clonal majoritairement détecté. D'autres clones internationaux ont été également détectés comme le CC1, CC25 et le CC85. De même, 18 nouveaux séquences types ont été caractérisés.

L'électrophorèse en champ pulsé a été réalisée sur 73 souches appartenant au ST2 dans le but d'étudier leur clonalité. Les résultats (Fig.2) ont montré que la majorité des souches (72.6% ; n=53) ont été classées dans un même cluster (C) qui semble être un clone prédominant au Liban. Ce dernier renferme des souches isolées de différents hôpitaux voire même de différentes régions, ce qui peut mettre en évidence une situation endémique et une possible transmission entre les hôpitaux. De même, trois autres clusters minoritaires ainsi que 10 profils uniques ont été caractérisés.

Malgré le fait que les résultats de typage par MLST ne furent pas toujours en corrélation avec ceux de l'ECP, les souches appartenant au ST2 étaient très liées. Cependant, il est recommandé d'utiliser les deux techniques lors de l'analyse d'un grand nombre des souches isolées de différentes régions à différents moments.

Dans le second « case report », deux souches d'*A.pittii* résistantes aux carbapénèmes et nommées CMUL332 et CMUL334 ont été collectées de deux différents hôpitaux à Tripoli, Nord du Liban. La première a été isolée de l'urine d'un enfant de 4 mois hospitalisé dans le service des soins intensifs pour une fièvre avec un syndrome néphrétique. La deuxième a été

également isolée de l'urine d'une fille adolescente de 15 ans admise à l'hôpital pour une gastroentérite fébrile. Les études de PCR en temps réel suivies du séquençage ont montré que les deux souches portaient le gène *bla*$_{\text{NDM-1}}$ et le gène *bla*$_{\text{OXA-72}}$ respectivement.

L'OXA-72 a été détectée pour la première fois chez une souche d'*A.pittii* en Colombie puis par la suite en France chez des souches résistantes aux carbapénèmes (Bonnin *et al.*, 2014b; Montealegre *et al.*, 2012). D'autre part, plusieurs études récentes ont montré la dissémination des souches d'*A.pittii* produisant le NDM-1 notamment en Asie, Europe et en Amérique du Sud (Pagano *et al.*, 2015; Roca *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2012).

Notre deuxième étude était la première rapportant la présence des souches d'*Acinetobacter* non *baumannii* portant ces deux gènes de carbapénémase sur le territoire libanais. Notons que dans une étude précédante, l'émergence au Liban des souches d'*A.baumannii* portant le gène *bla*$_{\text{NDM-1}}$ a été rapporté (Rafei *et al.*, 2014a).

Enfin, les résultats des deux études soulignent l'importance d'implémenter des mesures efficaces pour éviter la dissémination des souches multi-résistantes dans le milieu hospitalier et la transmission des gènes de résistance aux carbapénèmes vers d'autres espèces bactériennes.

II. Ecologie d'*Acinetobacter* spp au Liban

1. Introduction

Acinetobacter spp sont des bactéries Gram négatif, opportunistes longtemps décrites comme des agents responsables des infections nosocomiales notamment chez les patients gravement malades ou immunodéprimés (Fiester and Actis, 2013; Visca *et al.*, 2011). *A.baumannii* est par ailleurs la cause des infections communautaires graves en zones tropicale, infections chez des blessés en zones de guerre ainsi que des infections chez les survivants des catastrophes naturelles (Eveillard *et al.*, 2013). Ces observations peuvent soulever par conséquent la question d'un potentiel réservoir extrahospitalier malgré le fait que certains auteurs aient contesté cette notion (Peleg *et al.*, 2008; Towner, 2009).

Les *Acinetobacter* sont des bactéries ubiquitaires capables d'occuper plusieurs niches écologiques, elles sont d'ailleurs considérées par certains auteurs comme des « Weeds » (Cray *et al.*, 2013). Les nouveaux outils d'identification moléculaire ont sans doute permis de caractériser certains réservoirs en dehors des hôpitaux, même si le cycle de transmission de ces bactéries entre ces différents environnements reste encore mal élucidé. Ainsi, la présence dans l'environnement d'*A.baumannii* et autres espèces a été rapportée dans plusieurs publications, notamment dans des prélèvements de sol contaminés ou non par des hydrocarbures, dans des effluents, des prélèvements d'eau et sur des surfaces en contact avec l'homme. De même, les *Acinetobacter* ont été détectés sur des végétaux et dans certains produits alimentaires tels que la viande, le lait, et les poissons (Al Atrouni *et al.*, 2016b; Eveillard *et al.*, 2013).

En outre, le portage d'*A.baumannii* et des autres espèces d'*Acinetobacter* a été rapporté chez les animaux de compagnie, les animaux d'élevage, les chevaux, mais également chez les invertébrés (Al Atrouni *et al.*, 2016b; Eveillard *et al.*, 2013). Des souches multi-résistantes ont également été isolées (Bayssari *et al.*, 2015; Hérivaux *et al.*, 2016; Pailhoriès *et al.*, 2016b).

Récemment, plusieurs travaux ont été réalisés pour explorer la structure de la population d'*A.baumannii* dans l'environnement et chez les animaux en utilisant les techniques moléculaires de typage. Ces études ont rapporté tantôt la circulation des clones similaires à ceux retrouvés en milieu hospitalier (Belmonte *et al.*, 2014; Hérivaux *et al.*, 2016; Pailhoriès *et al.*, 2015b), et tantôt une diversité des clones qui étaient différents de ceux isolés chez les patients (Hamouda *et al.*, 2011; Pailhoriès *et al.*, 2015b, 2016b).

Au Liban, les premières données sur l'écologie d'*Acinetobacter* spp en dehors des hôpitaux ont été rapportées par Rafei *et al.* Dans leur étude, des échantillons de l'environnement (eau, sol), des animaux, des produits alimentaires (lait, viande) ont été collectés surtout au Nord du Liban. Ainsi, plusieurs espèces d'*Acinetobacter* notamment *A.baumannii* ont été isolées et les auteurs ont montré la présence des séquence types non identifiés auparavant dans les hôpitaux libanais, y compris des nouveaux (Rafei *et al.*, 2015a).

Afin de donner une vue globale sur l'épidémiologie extrahospitalière d'*Acinetobacter* spp, une autre étude à grande échelle a été réalisée. Dans un premier temps, 641 prélèvements de l'environnement (sols, boues, eau de source, eau des puits) ont été réalisés dans plusieurs régions au Liban. Dans un second temps, 436 échantillons de produits destinés à l'alimentation, y compris des végétaux (n=100), des poissons (n=106), et du lait cru (n=230), ont été collectés des marchés locaux et des fermes.

La 3ème partie de ce travail a consisté en l'étude du portage d'*Acinetobacter* spp chez les animaux notamment de compagnie et d'élevage. Au total, 230 animaux ont été prélevés à la fois au niveau de la gueule et du rectum. Enfin, et pour la première fois au Liban, une partie a été consacrée à l'étude de colonisation cutanée par *Acinetobacter* spp chez plusieurs groupes d'individus. Pour cela, 377 individus ont participé à cette étude et deux écouvillons au niveau du coude et les orteils ont été analysés. A la suite de la mise en culture des prélèvements obtenus des différentes parties, toutes les souches ont été identifiées par PCR, spectrométrie de masse de type MALDI-TOF, et séquençage partiel du gène *rpo*B, et ont caractérisées du point de vue de leur sensibilité aux antibiotiques. Pour les souches d'*A.baumannii*, le typage par MLST a été réalisé pour étudier la structure de la population.

2. Article 3: Diversity of Acinetobacter species isolated from different environments in Lebanon: a nationwide study

Ahmad Al Atrouni[1, 2], Monzer Hamze[1] , Rayane Rafei[1], Matthieu Eveillard[2,3], Marie-Laure Joly-Guillou [2,3], Marie Kempf[2, 3]*

[1]Laboratoire Microbiologie Santé et Environnement (LMSE), Ecole Doctorale des Sciences et de Technologie et Faculté de Santé Publique, Université Libanaise, Tripoli, Liban

[2]ATOMycA, Inserm Atip-Avenir Team, CRCNA, Inserm U892, 6299 CNRS, University of Angers, France.

[3]Laboratoire de Bactériologie, Institut de Biologie en Santé –Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France.

**** Corresponding author***

Laboratoire de Bactériologie, Institut de Biologie en Santé

Centre Hospitalier Universitaire Angers

4 rue Larrey

49933 Angers cedex, France.

Phone: (33) 2 41 35 50 13. Fax: (33) 2 41 35 41 64

Email: makempf@chu-angers.fr

RESEARCH ARTICLE

For reprint orders, please contact: reprints@futuremedicine.com

Future MICROBIOLOGY

Diversity of *Acinetobacter* species isolated from different environments in Lebanon: a nationwide study

Ahmad Al Atrouni[1,2], Monzer Hamze[1], Rayane Rafei[1], Matthieu Eveillard[2,3], Marie-Laure Joly-Guillou[2,3] & Marie Kempf*[,2,3]

Aim: To investigate the extrahospital reservoirs of *Acinetobacter* spp. in Lebanon. **Materials & methods:** Two thousand three hundred and sixty-one samples from different ecological niches were analyzed by culture methods. Species identification was confirmed by *rpo*B-gene sequencing. Multilocus sequence typing was used to characterize the *Acinetobacter baumannii* clones. **Results & conclusion:** *Acinetobacter* spp. were detected in 14% of environmental samples and 8% of food samples. Furthermore, 9% of animals and 3.4% of humans were colonized. Non-*baumannii Acinetobacter* were the most common species isolated and newly susceptible *A. baumannii* clones were detected. Interestingly, 21 isolates were not identified at the species level and were considered as putative novel species. To our knowledge, this is the largest epidemiological study investigating the epidemiology of *Acinetobacter* spp. outside hospitals.

First draft submitted: 2 May 2016; Accepted for publication: 8 June 2016;
Published online: 22 August 2016

KEYWORDS
• *A. baumannii*
• *Acinetobacter* spp.
• animals • environment
• extrahospital • food
• humans • Lebanon • novel species • reservoirs

Acinetobacter spp., belonging to the *Moraxellaceae* family, is a group of gram-negative, nonfermentative, oxidase-negative and strictly aerobic bacteria [1]. This genus contains both nonpathogenic and pathogenic species that prevail in many ecological niches and are considered by some authors as microbial 'weeds' [2,3]. Of these, *Acinetobacter baumannii* has evolved as a global pathogen causing nosocomial infections in immunocompromised and critically ill patients, but also community-acquired infections or war and natural disaster-related infections [4,5]. Besides, the role of other *Acinetobacter* species in human infections has been increasingly recognized thanks to the advances in molecular biology that allowed better identification at a species level. Noteworthy, there are increasing reports of multidrug-resistant non-*baumannii Acinetobacter*, such as *Acinetobacter pittii*, *Acinetobacter nosocomialis*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter guillouiae* and *Acinetobacter soli* that cause infections in healthcare facilities around the world [6–10].

Presence of *Acinetobacter* spp. outside the hospital settings has been intensively documented. They have for long been described from a wide range of environmental sources including soils, fresh water, sediments, activated sludge and sewage treatment plants [11]. More recently, *Acinetobacter* spp. were recovered from a variety of foodstuffs including raw vegetables, raw milk, fish, cheese and meat [11]. Humans could also constitute a potential reservoir for these opportunistic bacteria that are able to colonize the skin and the intestine of healthy people [11,12]. Finally, *Acinetobacter* spp. have been described as emerging pathogens in veterinary clinics [13,14], but were also carried by

[1]Laboratoire Microbiologie Santé et Environnement (LMSE), Ecole Doctorale des Sciences et de Technologie et Faculté de Santé Publique, Université Libanaise, Tripoli, Liban
[2]ATOMycA, Inserm Atip-Avenir Team, CRCNA, Inserm U892, 6299 CNRS, University of Angers, France
[3]Laboratoire de Bactériologie, Institut de Biologie en Santé – Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France
*Author for correspondence: Tel.: +33 2 41 35 50 13; Fax: +33 2 41 35 41 64; makempf@chu-angers.fr

Future Medicine part of fsg

some animals including livestock animals, pets, horses, arthropods and lice [11].

The aims of the present study were to investigate different ecological niches for the presence of *Acinetobacter* spp. in order to characterize the potential extrahospital reservoirs of these bacteria, as well as to explore the different clones of *A. baumannii* strains circulating outside the hospitals.

Materials & methods

• Sample collection

Environment

Three hundred and forty-one soil samples were collected either from agriculture zones (n = 284), from soils near contaminated sites and human activities (n = 50) or from soils near zones intact of human activities (n = 7). Besides, 300 water samples were obtained from artesian wells (n = 155), natural sources (n = 115) and sewage (n = 30). All samples were suspended in Baumann enrichment medium as described previously [15].

Foodstuffs

One hundred samples of different vegetables purchased from supermarkets or greengrocers were cut aseptically into very small pieces and 5–10 g were shaken vigorously for 15 min in 15 ml of physiological water. Then, 5 ml were suspended in 20 ml of Baumann medium. Besides, 106 seawater fishes were purchased from local markets situated in Tripoli, north of Lebanon. The animals were dissected and two samples from each fish (intestine and flesh) were removed aseptically and diluted (10%) in physiological water. The suspension was homogenized for 2 min with a Stomacher bag. Then, 1 ml was suspended in 9 ml of Baumann medium. Finally, 230 samples of raw healthy cow milk were collected and treated as described in a previous study [15].

Animals

Overall, 230 animals including pets (n = 94), livestock (n = 85), horses (n = 30) and pigeons (n = 21) were sampled. Pets sampling was conducted in three veterinary clinics whereas the other samples were collected from farms situated in different districts. A standardized questionnaire was completed for each pet to obtain information such as the type of animal, its age, living in a household with other animals, the type of visit to the veterinarian (hospitalization or outpatient visit), the reason of the hospitalization or outpatient visit, antibiotherapy within the last 15 days, and the presence of symptoms of infection. For all the animals, both rectal and oral swabs were collected except for pigeons and some pets for which only oral swabs were collected. The swabs were then directly discharged in 10 ml of Baumann medium.

Human skin carriage

Four groups of people were studied, outpatients admitted to two medical centers situated in Tripoli, (n = 76; mean of age: 21), students of the Faculty of Public Health – Lebanese University (n = 101; mean of age: 20), nurses working in different departments of Nini hospital (n = 92; mean of age: 32) and children with low income studying in an internal school (n = 108; mean of age: 7). A total number of 754 samples were collected. Cotton swabs remoistened with Baumann medium were rubbed vigorously, with rotation, over approximately 6 cm^2 sites. Due to ethical concepts, swabbing was performed only on two body sites including antecubital fossa and toe webs. Consent was given orally by all the participants.

• Bacterial culture & identification

All enriched samples were mixed on a rotor shaker at 200 rpm for 48 h at 30°C. Cultures were streaked on MacConkey agar and incubated at 30°C for 48 h [15]. Bacterial identification was initially performed by conventional PCR targeting 16S rRNA [16], MALDI-TOF mass spectrometry and confirmed at the species level by partial *rpo*B-gene sequencing as described previously [17].

• Susceptibility testing & investigation of carbapenemase-encoding genes

Antibiotic susceptibility testing was performed by the disc diffusion method according to the recommendations of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing [18]. The antibiotics tested were ticarcillin, ticarcillin/clavulanate, piperacillin /tazobactam, ceftazidime, imipenem, ciprofloxacin, amikacin, gentamicin, tobramycin, co-trimoxazole, colistin, netilmicin, doxycycline and rifampin. Resistance to carbapenem was confirmed by determining the MIC of imipenem and meropenem with Etest strips (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France). All identified carbapenem-resistant isolates were investigated by PCR assays for the presence of the carbapenemase-encoding genes bla_{OXA-23}, bla_{OXA-24} and bla_{OXA-58} [19].

• Epidemiological typing

Genotyping was performed on all identified *A. baumannii* isolates using multilocus sequence typing (MLST). MLST was done according to the Pasteur scheme [20]. The new sequence types (STs) have been assigned by MLST Pasteur and the bacterial population was analyzed with eBURST.

Results

• Bacterial identification

In our study, a total number of 2361 samples were investigated. They were collected from environment, animals, food products and humans in different regions of Lebanon during two periods: the first one between September 2014 and February 2015, and the second one between August and December 2015. Overall, 171 *Acinetobacter* spp. were isolated. Among them, 88 (51.5%) were recovered from the environment and were isolated mainly in north of Lebanon **(Figure 1)**. *A. pittii* was the most common species found (n = 34; 40.0%) followed by *A. calcoaceticus* and *A. baumannii* that accounted for 14 (16.0%) and 12 (13.6%), respectively, of all environmental strains **(Table 1)**. These strains were mainly isolated from soil samples near agriculture zones, but also from water and other contaminated sites, such as sewage and soil near human activities. *A. pittii* and *A. baumannii* were the predominant species found during the second period (between August and December 2015), while the other *Acinetobacter* species were mainly isolated in the first one (between September 2014 and February 2015).

Besides, *Acinetobacter* spp. were isolated from 30 out of 100 (30.0%) vegetable samples. The most common species were *A. guillouiae* and *Acinetobacter bereziniae* at a frequency of 30.0 and 27.0%, respectively. On the other hand, 12 out of 230 raw milk samples and three out of 212 fish samples, were positive for *Acinetobacter* spp., with *A. bereziniae* being the most prevalent species. Remarkably, *A. baumannii* was not detected from foodstuff samples **(Table 1)**.

Among the 230 animals investigated, only 21 (9.0%) were colonized with *Acinetobacter* spp., in their oral flora, their intestine, or in both. The prevalence of *Acinetobacter* spp. carriage was 8.5% for pets, 8.2% for livestock and 23.0% for horses, which were mainly colonized by *A. Acinetobacter gandensis.* In addition, it has been shown that only two cats were colonized by *A. baumannii* **(Table 1)**.

Concerning human skin carriage, only 16 *Acinetobacter* spp. isolates were recovered, from 11 students (14 isolates) and two nurses (two isolates), giving colonization rates of 3.4% (13/377). The strains were isolated from antecubital fossa (six students), toe webs (four students) or from both (three students). Remarkably, all the students were colonized by *Acinetobacter schindleri* even at two different sites, whereas the two nurses were colonized by *Acinetobacter ursingii* and *A. bereziniae*.

Finally, 21 isolates were not identified at the species level by *rpo*B-gene sequencing and were considered as putative novel *Acinetobacter* species.

• Antimicrobial susceptibility testing

Antimicrobial testing showed that the majority of *Acinetobacter* spp. isolates were wild-type and had a susceptible phenotype to almost all of the antibiotics tested. Among them, only 38 isolates were intermediate and 18 resistant to ceftazidime, 21 isolates were intermediate and 18 resistant to ticarcillin, 23 isolates were intermediate and eight resistant to ticarcillin + clavulanic acid, in addition to two isolates that were nonsusceptible to piperacillin + tazobactam. Interestingly, two *A. calcoaceticus* strains showed resistance to carbapenems. They were isolated from vegetables and were resistant to imipenem (MIC = 16 mg/l both) and meropenem (MIC = 16 mg/l both). Real-time PCR revealed that these two isolates harbored the $bla_{\text{OXA-24}}$ gene. Sequencing of the carbapenemase genes showed that they both encoded for the Oxa-72 variant. Resistance to other groups of antimicrobial agents was also sporadically detected, such as to tobramycin (n = 4), gentamicin (n = 2), cotrimoxazole (n = 2), doxycyclin (n = 1) and ciprofloxacin (n = 1).

• Epidemiological typing

MLST was performed on the 15 identified *A. baumannii* isolates. Among them, two environmental isolates were assigned to ST271 and ST350; while two animal strains were assigned to ST20 and ST23 **(Table 2)**. The remaining isolates (ten from environment and one from an animal) had a new allelic recombination giving rise for new STs: ST813-ST822. Analysis of the relationship between the STs in this study and the existing STs using eBURST showed that ST271 was a double-locus variant of ST418, the predicted founder of CC5, ST20 and ST23 belonged to

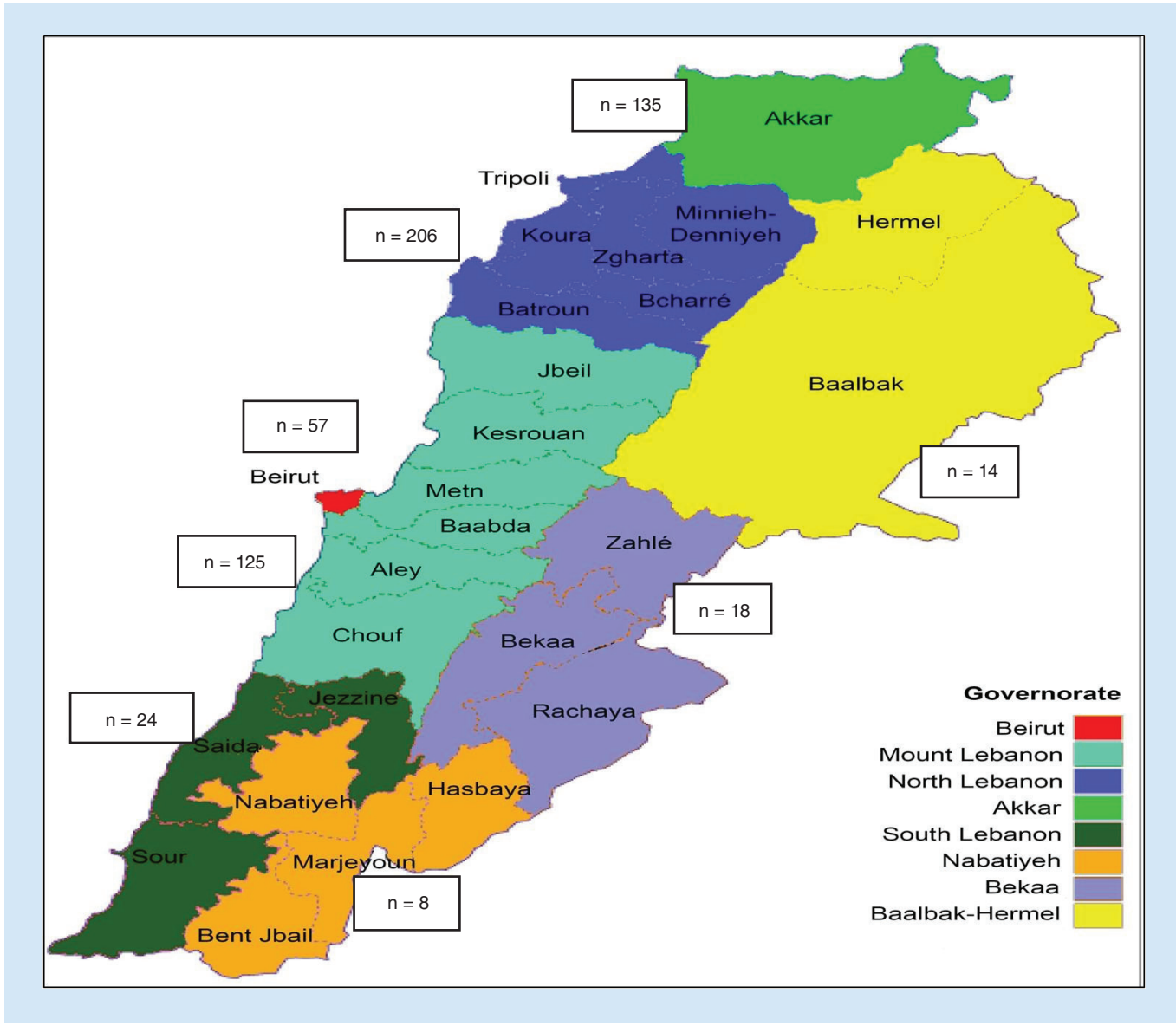


Figure 1. Distribution of environmental samples according to the regions. This figure represents the geographical map of Lebanon which is divided into eight governorates. The environmental samples were collected from different regions in Lebanon including north of Lebanon (n = 260), Akkar (n = 135), Mount Lebanon (n = 125), Beirut (n = 57), south of Lebanon (n = 24), Bekaa (n = 18), Baalbak (n = 14) and Nabatiyeh (n = 8).

CC1 and CC9 in which the predicted founder were ST1 and ST10, respectively. Among the newly described STs, only ST814 shared similarity with ST822 while the remaining identified STs were singletons.

Discussion

In this study, we investigated a wide range of different reservoirs in Lebanon for the presence of *Acinetobacter* spp. We showed that their prevalence was 18.8% in soil and 8.0% in water samples. Interestingly, the majority of the strains were isolated in north of Lebanon. Isolation of *Acinetobacter* spp. from soil and water has been documented worldwide [21–25]. Remarkably, our results were slightly different to those of a previous study performed in Lebanon, which showed a prevalence of 18.0% in both types of samples [15]. Besides, we observed here a wide diversity of *Acinetobacter* species whereas only *A. pittii*, *A. calcoaceticus* and *A. baumannii* were detected in the previous study [15]. Additionally, we report here the first detection of *A. baumannii* strains isolated from soil and sewage samples in

Lebanon. The noticeable differences between both studies are that in the first one, samples were collected mainly from north of Lebanon, whereas the present study includes more samples collected from other regions in Lebanon. Since the climate in these different regions is not constant, these findings could highlight a potential role of climatic factors that may influence the prevalence and the diversity of species in the ecological niches [11,26–27].

Table 1. Distribution of the identified *Acinetobacter* species according to the sources of samples.

Acinetobacter species (n)	Environmental isolates (n)	Foodstuffs isolates (n)	Animal isolates (n)	Human samples (n)
A. baumannii (n = 15)	Soil: agriculture (n = 3) Soil: near human activities (n = 8) Sewage (n = 1)		Cat: oral flora (n = 2) Cat: anus (n = 1)	
A. bereziniae (n = 15)	Water: artesian well (n = 1)	Raw cow milk (n = 5) Vegetables (n = 8)		Skin: antecubital fossa (n = 1)
A. calcoaceticus (n = 16)	Soil: agriculture (n = 6) Water: artesian well (n = 7) Water: natural source (n = 1)	Vegetables (n = 2)		
A. gandensis (n = 7)	Water: artesian well (n = 1)		Horses: feces (n = 6)	
A. guillouiae (n = 16)	Soil: agriculture (n = 4) Soil: near human activities (n = 1)	Vegetables (n = 9) Raw cow milk (n = 2)		
A. johnsonii (n = 6)	Water: natural source (n = 1)	fishes: intestine (n = 2)	Horses: feces (n = 1) Cat: anus (n = 2)	
A. junii (n = 6)	Water: artesian well (n = 1) Water: natural source (n = 1) Soil: near human activities (n = 1)	Vegetables (n = 2)	Cat: anus (n = 1)	
A. lwoffii (n = 3)	Soil: agriculture (n = 1)	Vegetables (n = 2)		
A. oleivorans (n = 1)	Soil: agriculture (n = 1)			
A. pittii (n = 40)	Soil: agriculture (n = 16) Soil: human activities (n = 10) Soil: intact of human activities (n = 2) Sewage (n = 3) Water: natural source (n = 1) Water: artesian well (n = 2)	Raw cow milk (n = 1)	Livestock: oral flora (n = 3) Cat: oral flora (n = 1) Dog: oral flora (n = 1)	
A. radioresistens (n = 1)			Livestock: oral flora (n = 1)	
A. schindleri (n = 15)	Water: artesian well (n = 1)			Skin: antecubital fossa (n = 7) Skin: toe webs (n = 7)
A. soli (n = 3)	Water – natural source (n = 2)		Cow: oral flora (n = 1)	
A. ursingii (n = 3)	Soil – agriculture (n = 1)	Raw cow milk (n = 2)		Skin: antecubital fossa (n = 1)
A. venetianus (n = 1)	Water – artesian well (n = 1)			
A. genomspecies 16BJ (n = 1)		Raw cow milk (n = 1)		
Putative novel species (n = 21)	Soil – agriculture (n = 9) Soil – near human activities (n = 1)	Fishes: skin (n = 1) Vegetables (n = 7) Raw cow milk (n = 1)	Cow: oral flora (n = 2)	
Total, n = 171	88	45	22	16

Table 2. Characteristics of *Acinetobacter baumannii* strains identified in this study.

Strain	Origin	Context	City of isolation	ST	CC
ENV1	Soil	Public garden	Tripoli	813	Singleton
ENV2	Soil	Public garden	Tripoli	271	CC5
ENV3	Soil	Agriculture	Akkar	814	CC32
ENV4	Soil	Agriculture	Menye	815	Singleton
ENV5	Soil	Agriculture	Menye	816	Singleton
ENV6	Water	Sewages	Chekka	817	Singleton
ENV7	Soil	Industry	Chekka	818	Singleton
ENV8	Soil	Industry	Chekka	818	Singleton
ENV9	Soil	Industry	Chekka	350	Singleton
ENV10	Soil	Public garden	Kalamoun	819	Singleton
ENV11	Soil	Public garden	Kalamoun	820	Singleton
ENV12	Soil	Public garden	Tripoli	821	Singleton
AN1	Cat	Anal swab	Beirut	20	CC1
AN2	Cat	Oral swab	Beirut	822	CC32
AN3	Cat	Oral swab	Beirut	23	CC9

CC: Clonal complex; ST: Sequence type.

We have examined raw vegetables collected from soil in agriculture zones, as an indicator of contamination of the environment. Our results showed that 30.0% of samples harbored *Acinetobacter* spp. and that the most common species were *A. guillouiae* and *A. bereziniae.* Similar observations were done in studies conducted in London and Hong Kong, where 17.0 and 50.0% of the vegetables, respectively, were tested positive for *Acinetobacter* spp. These studies also showed a predominance of the species *A. guillouaie*, *A. baumannii* and *A. pittii* [21,28]. All those findings suggested that vegetables may be a potential habitat for *Acinetobacter* spp. and could serve as vehicle of transmission into hospitals.

Acinetobacter spp. also have been reported from milk samples with different prevalences in several countries such as in the USA, 1.3% [29]; in Kenya, 5% [30]; in Korea, 0.3% and 7.7% [31,32]. In Lebanon, the data are limited. Since only one *A. baumannii* isolate was detected from 37 milk samples analyzed in the previous study [15], our group conducted a large epidemiological study to investigate the presence of *Acinetobacter* spp. in 230 samples of raw cow milk collected from different farms in Lebanon. Among them, 12 (5.2%) were positive. The low rate of *Acinetobacter* in milk samples could be explained by presence of other competent bacteria, such as Enterobacteriaceae and the use of selective medium, as it has been described by Gurung *et al.* [32].

Acinetobacter spp. were found in aquatic food [33,34]. Recently, studies using metagenomic approaches to investigate the intestinal ecosystem of fishes showed that *Acinetobacter* spp. were one of the most abundant genera detected [35,36]. These observations led us to investigate fishes collected from local markets. As results, only three of them were colonized with *Acinetobacter* spp. This low prevalence may be explained by the fact that animals were not collected from rivers where there are more favorable conditions to enhance the growth of these bacteria.

Although *Acinetobacter* spp. were frequently described from environmental reservoirs, recent studies have highlighted the presence of animal reservoirs. Thus, for example there are several reports of *A. baumannii* isolated from dogs, cats, pigs and chicken [14,37–39]. More recently, *A. gandensis* was described for the first time from horses and cattle [40]. In our study, 424 animal samples were analyzed. Of them, only 22 were positive for *Acinetobacter* spp. In Lebanon, previous studies have reported the detection of *Acinetobacter* spp. from animal origin [15,41]. However, the isolation rates in those studies were higher than those of our study. In addition, *A. baumannii* and *A. pittii* were rarely detected here while they were the most abundant species recovered from animals in the previous study [15].

Notwithstanding their ability to cause several infections [1], it is largely accepted that members of the *Acinetobacter* genus are normal inhabitants of the human skin [42–45]. To our knowledge, investigation of skin colonization for the presence

of *Acinetobacter* spp. has never been performed in Lebanon. Therefore, we studied skin colonization of four groups of people living in different conditions to further elucidate other potential reservoirs of these bacteria. *Acinetobacter* were recovered from only 3.4% of the participants. This rate is lower than that reported in the literature, probably due to the lesser number of body sites investigated here. Interestingly, we showed that the students were more colonized than nurses despite the contact of the latter with hospital settings. Besides, we did not find any *Acinetobacter* spp. on the skin of outpatients and children. We speculated that it would be a seasonal variation since the students were investigated in the beginning of fall while it was in winter for the other participants. However, no overall conclusion can be drawn because participants were investigated only once during this survey.

In this study, we tested antibiotic susceptibility of all identified isolates. The majority of them were susceptible to almost all antimicrobial agents tested. We, however, reported for the first time the presence of an Oxa-72-producing *A. calcoaceticus* isolated from two vegetables. Concerning the other isolates, respectively 33.0, 22.0 and 18.0% were not susceptible to ceftazidime, ticarcillin and ticarcillin/clavulanate, highlighting the potential presence of extrahospital reservoirs of resistance genes.

Analysis of *A. baumannii* population structure by MLST revealed a notable variety of STs isolated from environment and animals, with the description of ten new sequence types. These findings were consistent with those of previous studies conducted on environmental and animal samples [15,46], but were not in accordance to those of Hamouda *et al.,* and Belmonte *et al.,* who found only limited genotypes in their studies [37,39]. Interestingly, some of STs described here were identical to those isolated in human infections. Thus, for example, ST20, which was isolated in our study from a rectal sample of a cat, has recently been reported as responsible for human infections in different countries and described as carbapenem resistant [47–49]. ST20 has also been reported from pets in Switzerland [14]. ST23, which was isolated from a cat oral swab, has been detected from carbapenem-resistant strains isolated from hospitalized patients in Norway [50]. ST271 and ST350, which were isolated from soil samples, were first detected from wound samples in Spain and chicken in Switzerland [Tomas M, Perreten V, Unpublished Data]. Remarkably, none of the STs identified here were detected in the previous studies of Rafei *et al.*, either in or outside hospitals [15,51], which may highlight the diversity of *A. baumannii* clones that circulate in the Lebanese environment. These findings may reinforce that these opportunistic bacteria undergo a continuous genome evolution that help them toward clinical success [52].

Finally, it is well known that the environment may constitute a potential reservoir of novel species of *Acinetobacter* spp. [11]. In this study, we have isolated 21 strains that were not identified at the species level due to the low levels of nucleotide homology with all available described *Acinetobacter* species. Therefore, further experiments are required to allow the identification of these isolates which may be putative novel species.

Conclusion & future perspective

Our study evidences the diversity of extra hospitals reservoirs of *Acinetobacter* spp. in Lebanon, with non-*baumannii Acinetobacter* being the most predominant species. Despite the low prevalence, we note here the emergence of newly susceptible circulating clones of *A. baumannii* that are able to occupy mostly environmental and animal niches. Furthermore, the presence of multidrug-resistant isolates in the environment remains an important public health problem and appropriate strategies should be implemented to avoid excessive use of antimicrobial agents and to limit environment contamination with this kind of bacteria. However, further studies are required to elucidate the cycle of transmission of these bacteria between these different habitats and to explore the origin of multidrug-resistant isolates circulating in the hospitals.

Acknowledgements

The authors would like to thank the team of the Institute Pasteur MLST system (Paris, France) for importing novel alleles, profiles and isolates at www.pasteur.fr/mlst. They would also thank S Omarieh, T Abdo, M Yehya, FO Charrouf and C Quinqueneau for their excellent technical assistance. The authors gratefully thank M Mattar, M Diab and the veterinary doctors W Darwich and R Outour who participated in this study.

Financial & competing interests disclosure

This work was supported by the Lebanese University and the National Council for Scientific Research, Lebanon.

The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Ethical conduct of research

The authors state that they have obtained appropriate institutional review board approval or have followed the principles outlined in the Declaration of Helsinki for all human or animal experimental investigations. In addition, for investigations involving human subjects, informed consent has been obtained from the participants involved.

EXECUTIVE SUMMARY

Acinetobacter spp.: general characteristics

- *Acinetobacter* spp. are gram-negative bacteria behaving as microbial weeds. They are able to occupy several ecological niches including environment, foodstuff, animals and humans.
- Particularly in intensive care units, they are able to cause a wide range of infections in immunocompromised hosts.

Acinetobacter spp. outside the hospitals

- In this study, approximately 51.0% of *Acinetobacter* isolates were cultured from environmental samples. The prevalence was 18.8% in water and 8% in soils.
- Food samples, especially the vegetables, were an important reservoir for *Acinetobacter* spp., suggesting a potential contamination of the agriculture zones.
- Animals and humans were also colonized by *Acinetobacter* spp. The rates of colonization were 9.0 and 3.4%, respectively.
- A wide diversity of *Acinetobacter* species have been isolated with non-*baumannii Acinetobacter* being the predominant ones.
- Twenty-one strains may be putative novel species due to the low levels of nucleotide homology with all available described *Acinetobacter* species.

Antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* species

- 33, 22 and 18% of our isolates were not susceptible to ceftazidime, ticarcillin and ticarcillin/clavulanate, respectively, while the remaining strains were susceptible to almost all of the antimicrobial agents tested.

Acinetobacter baumannii population structure

- Multilocus sequence typing analysis of *A. baumannii* isolates revealed the presence of 14 sequence types, among them ten were novel sequence types suggesting that this bacterium undergo a continuous genomic evolution.

Conclusion & future perspective

- This study evidences the diversity of extrahospitals reservoirs of *Acinetobacter* spp. in Lebanon.
- The presence of multidrug-resistant isolates in the environment is an important public health problem.
- Further studies are needed to elucidate the origin of outbreak strains circulating in the hospitals.

References

Papers of special note have been highlighted as:
• of interest; •• of considerable interest

1 Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii:* emergence of a successful pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 21(3), 538–582 (2008).

2 De Berardinis V, Durot M, Weissenbach J, Salanoubat M. *Acinetobacter baylyi* ADP1 as a model for metabolic system biology. *Curr. Opin Microbiol.* 12(5), 568–576 (2009).

3 Cray JA, Bell ANW, Bhaganna P, Mswaka AY, Timson DJ, Hallsworth JE. The biology of habitat dominance; can microbes behave as weeds? *Microb. Biotechnol.* 6(5), 453–492 (2013).

• **The management of infections caused by *Acinetobacter* spp. is becoming an increasing threat of major concern.**

4 Visca P, Seifert H, Towner KJ. *Acinetobacter infection* – an emerging threat to human health. *IUBMB Life.* 63(12), 1048–1054 (2011).

5 Fiester SE, Actis LA. Stress responses in the opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Future Microbiol.* 8(3), 353–365 (2013).

6 Yang J, Chen Y, Jia X *et al.* Dissemination and characterization of NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* in an intensive care unit in China. *Clin. Microbiol. Infect.* 18(12), e506–e513 (2012).

7 Schleicher X, Higgins PG, Wisplinghoff H *et al.* Molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter nosocomialis* in

Germany over a 5-year period (2005-2009). *Clin. Microbiol. Infect.* 19(8), 737–742 (2013).

8 Li P, Yang C, Xie J *et al. Acinetobacter calcoaceticus* from a fatal case of pneumonia harboring blaNDM-1 on a widely distributed plasmid. *BMC Infect. Dis.* 18(15), 131 (2015).

9 Bošnjak Z, Plecko V, Budimir A, Mareković I, Bedenić B. First report of NDM-1-producing *Acinetobacter guillouiae*. *Chemotherapy* 60(4), 250–252 (2014).

10 Endo S, Yano H, Kanamori H *et al.* High frequency of *Acinetobacter soli* among *Acinetobacter* isolates causing bacteremia at a Tertiary Hospital in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 52(3), 911–915 (2014).

•• **Overview on the ecology and the reservoirs of non-*baumannii Acinetobacter* species.**

11 Al Atrouni A, Joly-Guillou ML, Hamze M, Kempf M. Reservoirs of non-*baumannii Acinetobacter* species. *Front. Microbiol.* 7, 49 (2016).

12 Zeana C, Larson E, Sahni J, Bayuga SJ, Wu F, Della-Latta P. The epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii:* does the community represent a reservoir? *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 24(4), 275–279 (2003).

13 Zordan S, Prenger-Berninghoff E, Weiss R *et al.* Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in veterinary clinics, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 17(9), 1751–1754 (2011).

14 Endimiani A, Hujer KM, Hujer AM *et al. Acinetobacter baumannii* isolates from pets and horses in Switzerland: molecular characterization and clinical data. *J. Antimicrob. Chemother.* 66(10), 2248–2254 (2011).

•• **First study conducted in Lebanon to investigate the presence of *Acinetobacter baumannii* outside hospitals.**

15 Rafei R, Hamze M, Pailhoriès H *et al.* Extra-human epidemiology of *Acinetobacter baumannii* in Lebanon. *Appl. Environ. Microbiol.* 81(7), 2359–2367 (2015).

16 Vanbroekhoven K, Ryngaert A, Wattiau P, Mot R, Springael D. *Acinetobacter* diversity in environmental samples assessed by 16S rRNA gene PCR-DGGE fingerprinting. *FEMS Microbiol. Ecol.* 50(1), 37–50 (2004).

17 Gundi VAKB, Dijkshoorn L, Burignat S, Raoult D, La Scola B. Validation of partial *rpo*B gene sequence analysis for the identification of clinically important and emerging *Acinetobacter* species. *Microbiology.* 155(7), 2333–2341 (2009).

18 EUCAST. www.eucast.org

19 Mesli E, Berrazeg M, Drissi M, Bekkhoucha SN, Rolain JM. Prevalence of carbapenemase-encoding genes including New Delhi metallo-β-lactamase in *Acinetobacter* species, Algeria. *Int. J. Infect. Dis.* 17(9), e739–e743 (2013).

20 *Acinetobacter baumannii* MLST Databases. http://pubmlst.org/abaumannii/

21 Houang ET, Chu YW, Leung CM *et al.* Epidemiology and infection control implications of *Acinetobacter* spp. in Hong Kong. *J. Clin. Microbiol.* 39(1), 228–234 (2001).

22 Yoon J-H, Kim I-G, Oh T-K. *Acinetobacter marinus* sp. nov. and *Acinetobacter seohaensis* sp. nov., isolated from sea water of the Yellow Sea in Korea. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17(11), 1743–1750 (2007).

23 Kim D, Baik KS, Kim MS *et al. Acinetobacter soli* sp. nov., isolated from forest soil. *J. Microbiol. Seoul Korea.* 46(4), 396–401 (2008).

• ***Acinetobacter* spp.: ubiquitous germs able to inhabit different types of environments.**

24 Choi J-Y, Kim Y, Ko EA *et al. Acinetobacter* species isolates from a range of environments: species survey and observations of antimicrobial resistance. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 74(2), 177–180 (2012).

25 Choi JY, Ko G, Jheong W *et al. Acinetobacter kookii* sp. nov., isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63(Pt 12), 4402–4406 (2013).

26 McMichael AJ, Woodruff RE, Hales S. Climate change and human health: present and future risks. *Lancet Lond. Engl.* 367(9513), 859–869 (2006).

27 Epstein P. The ecology of climate change and infectious diseases: comment. *Ecology* 91(3), 925–928; discussion 928–929 (2010).

28 Berlau J, Aucken HM, Houang E, Pitt TL. Isolation of *Acinetobacter* spp. including *A. baumannii* from vegetables: implications for hospital-acquired infections. *J. Hosp. Infect.* 42(3), 201–204 (1999).

29 Jayarao BM, Wang L. A study on the prevalence of gram-negative bacteria in bulk tank milk. *J. Dairy Sci.* 82(12), 2620–2624 (1999).

30 Ndegwa EN, Mulei CM, Munyua SJ. Prevalence of microorganisms associated with udder infections in dairy goats on small-scale farms in Kenya. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 72(2), 97–98 (2001).

31 Nam HM, Lim SK, Kang HM *et al.* Prevalence and antimicrobial susceptibility of gram-negative bacteria isolated from bovine mastitis between 2003 and 2008 in Korea. *J. Dairy Sci.* 92(5), 2020–2026 (2009).

32 Gurung M, Nam HM, Tamang MD *et al.* Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* from raw bulk tank milk in Korea. *J. Dairy Sci.* 96(4), 1997–2002 (2013).

33 Guardabassi L, Dalsgaard A, Olsen JE. Phenotypic characterization and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. isolated from aquatic sources. *J. Appl. Microbiol.* 87(5), 659–667 (1999).

34 Huys G, Bartie K, Cnockaert M *et al.* Biodiversity of chloramphenicol-resistant mesophilic heterotrophs from Southeast Asian aquaculture environments. *Res. Microbiol.* 158(3), 228–235 (2007).

• **Metagenomic studies revealed that *Acinetobacter* was one of the most abundant genus detected among the intestinal microbiota of aquatic animals.**

35 Hovda MB, Lunestad BT, Fontanillas R, Rosnes JT. Molecular characterisation of the intestinal microbiota of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture.* 272(1–4), 581–588 (2007).

36 Etyemez M, Balcázar JL. Bacterial community structure in the intestinal ecosystem of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as revealed by pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes. *Res. Vet. Sci.* 100, 8–11 (2015).

37 Hamouda A, Findlay J, Al Hassan L, Amyes SGB. Epidemiology of *Acinetobacter baumannii* of animal origin. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 38(4), 314–318 (2011).

38 Kempf M, Rolain JM, Diatta G *et al.* Carbapenem resistance and *Acinetobacter baumannii* in Senegal: the paradigm of a common phenomenon in natural reservoirs. *PloS ONE* 7(6), e39495 (2012).

39 Belmonte O, Pailhoriès H, Kempf M *et al.* High prevalence of closely-related *Acinetobacter baumannii* in pets according to a multicentre study in veterinary clinics, Reunion Island. *Vet. Microbiol.* 170(3–4), 446–450 (2014).

40 Smet A, Cools P, Krizova L *et al. Acinetobacter gandensis* sp. nov. isolated from horse and cattle. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64(Pt 12), 4007–4015 (2014).

• **First evidence of the detection of multidrug-resistant *A. baumannii* strains from livestock animals in Lebanon.**

41 Bayssari CA, Dabboussi F, Hamze M, Rolain J-M. Emergence of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in livestock animals in Lebanon. *J. Antimicrob. Chemother.* 70(3), 950–951 (2015).

42 Seifert H, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Pelzer N, Tjernberg I, Vaneechoutte M. Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *J. Clin. Microbiol.* 35(11), 2819–2825 (1997).

43 Berlau J, Aucken H, Malnick H, Pitt T. Distribution of *Acinetobacter* species on skin of healthy humans. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 18(3), 179–183 (1999).

44 Chu YW, Leung CM, Houang ET *et al.* Skin carriage of *Acinetobacters* in Hong Kong. *J. Clin. Microbiol.* 37(9), 2962–2967 (1999).

45 Patil JR, Chopade BA. Distribution and in vitro antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* species on the skin of healthy humans. *Natl. Med. J. India.* 14(4), 204–208 (2001).

46 Pailhoriès H, Belmonte O, Kempf M *et al.* Diversity of *Acinetobacter baumannii* strains isolated in humans, companion animals, and the environment in Reunion Island: an exploratory study. *Int. J. Infect. Dis.* 37, 64–69 (2015).

47 Di Popolo A, Giannouli M, Triassi M, Brisse S, Zarrilli R. Molecular epidemiological investigation of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in four Mediterranean countries with a multilocus sequence typing scheme. *Clin. Microbiol. Infect.* 17(2), 197–201 (2011).

48 Pournaras S, Gogou V, Giannouli M *et al.* Single-locus-sequence-based typing of blaOXA-51-like genes for rapid assignment of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates to international clonal lineages. *J. Clin. Microbiol.* 52(5), 1653–1657 (2014).

49 Jeannot K, Diancourt L, Vaux S *et al.* Molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible *Acinetobacter baumannii* in France. *PLoS ONE* 9(12), e115452 (2014).

50 Karah N, Giske CG, Sundsfjord A, Samuelsen Ø. A diversity of OXA-carbapenemases and class 1 integrons among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Sweden belonging to different international clonal lineages. *Microb. Drug Resist. Larchmt. N.* 17(4), 545–549 (2011).

51 Rafei R, Pailhoriès H, Hamze M *et al.* Molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* in different hospitals in Tripoli, Lebanon using blaOXA-51-like sequence based typing. *BMC Microbiol.* 15, 103 (2015).

•• **Evidence on the genome plasticity and the evolution of *A. baumannii*.**

52 Imperi F, Antunes LCS, Blom J *et al.* The genomics of *Acinetobacter baumannii*: insights into genome plasticity, antimicrobial resistance and pathogenicity. *IUBMB Life.* 63(12), 1068–1074 (2011).

3. Article 4: First report of OXA-72 producing *Acinetobacter calcoaceticus* in Lebanon

Ahmad Al Atrouni[1,2], Marie Kempf[2,3]*,Matthieu Eveillard[2,3], Rayane Rafei[1,4], Monzer Hamze[1,4], Marie-Laure Joly-Guillou [2,3]

[1]Laboratoire Microbiologie Santé et Environnement (LMSE), Centre AZM pour la recherche en Biotechnologie et ses applications, Ecole Doctorale des Sciences et de Technologie, Université Libanaise, Tripoli, Liban

[2]ATOMycA, Inserm Atip-Avenir Team, CRCNA, Inserm U892, 6299 CNRS, University of Angers, France.

[3]Laboratoire de Bactériologie, Institut de Biologie en Santé –Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France.

[4]Faculté de Santé Publique, Université Libanaise, Tripoli, Liban

**** Corresponding author***

Laboratoire de Bactériologie, Institut de Biologie en Santé

Centre Hospitalier Universitaire Angers

4 rue Larrey

49933 Angers cedex, France.

Phone: (33) 2 41 35 50 13. Fax: (33) 2 41 35 41 64

Email: makempf@chu-angers.fr

First report of Oxa-72-producing *Acinetobacter calcoaceticus* in Lebanon

A. Al Atrouni[1,2], M. Kempf[2,3], M. Eveillard[2,3], R. Rafei[1,4], M. Hamze[1,4] and M.-L. Joly-Guillou[2,3]

1) *Laboratoire Microbiologie Santé et Environnement (LMSE), Centre AZM pour la recherche en Biotechnologie et ses applications, Ecole Doctorale des Sciences et de Technologie, Université Libanaise, Tripoli, Lebanon,* 2) *ATOMycA, Inserm Atip-Avenir Team, CRCNA, Inserm U892, 6299 CNRS, University of Angers,* 3) *Laboratoire de Bactériologie, Institut de Biologie en Santé—Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France and* 4) *Faculté de Santé Publique, Université Libanaise, Tripoli, Lebanon*

Abstract

Emergence of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. has been increasingly reported worldwide. We report here the first detection of an *Acinetobacter calcoaceticus* isolate from vegetables in Lebanon carrying the bla_{Oxa-72} gene. These findings show that the Lebanese environment may constitute a potential reservoir for this antibiotic resistance gene.

New Microbes and New Infections © 2015 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.

Keywords: *Acinetobacter calcoaceticus*, bla_{Oxa-72}, carbapenem resistance, Lebanon, vegetables
Original Submission: 19 October 2015; **Accepted:** 16 November 2015
Article published online: 23 November 2015

Corresponding author: M. Kempf, Laboratoire de Bactériologie, Institut de Biologie en Santé, Centre Hospitalier Universitaire Angers, 4 rue Larrey, 49933 Angers cedex, France
E-mail: makempf@chu-angers.fr

Acinetobacter calcoaceticus is a Gram-negative aerobic bacterium that belongs to the *Acinetobacter calcoaceticus–Acinetobacter baumannii* complex [1]. It is ubiquitous in nature and can be isolated from soil samples and vegetables [2,3]. Even if *A. baumannii* is more able to cause infections with high mortality and morbidity, the role of *A. calcoaceticus* in nosocomial infections should not be underrated [4,5]. Carbapenems have been widely used to treat infections caused by multidrug-resistant *Acinetobacter*. However, resistance to carbapenems among this genus has been increasingly reported during the last years, especially in *A. baumannii,* and is becoming a serious public health problem worldwide. Carbapenem-hydrolyzing class D β-lactamases and metallo-β-lactamases are the most frequently encountered enzymes within this genus [6]. Several studies have reported the isolation of carbapenem-resistant *A. calcoaceticus* from clinical and environmental samples [3,5,7].

In the present study, two imipenem-resistant *A. calcoaceticus* strains isolated in Lebanon from vegetables were analysed. Bacterial identification was initially performed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF) and confirmed at the species level by partial *rpo*B gene sequencing, as previously described [2]. Antimicrobial susceptibility was determined by the disk diffusion method according to the recommendations of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (http://www.eucast.org). Resistance to imipenem and meropenem was confirmed by the Etest method. Etest results confirmed the carbapenem-resistant phenotype because the minimum inhibitory concentrations for imipenem and meropenem were 16 mg/L. In addition, both strains remained susceptible against piperacillin/tazobactam, ceftazidime, aminosides, tigecycline, rifampin, ciprofloxacin and colistin.

Screening of $bla_{OXA-23-like}$, $bla_{OXA-24-like}$ and $bla_{OXA-58-like}$ genes by real-time PCR revealed that both isolates carried the $bla_{OXA-24-like}$ gene and were negative for the other carbapenemase genes tested. Sequencing of the $bla_{Oxa-24-like}$ gene showed that it encoded for the Oxa-72 variant. This variant was first described in 2004 in an *A. baumannii* isolate sampled in Thailand (GenBank accession no. AY739646.1). Since then, the variant has been reported worldwide from carbapenem-resistant clinical isolates of *Acinetobacter* spp. but has never been described in *A. calcoaceticus* [8,9]. In our study, we found for the first time the presence of the bla_{Oxa-72} variant in *A. calcoaceticus* isolated in Lebanon from two vegetables purchased from the same market in Beirut. Isolation of this multidrug-resistant bacterium may reflect a possible contamination of the environment surrounding the agriculture zones, such as irrigation water or the soil itself, or it may highlight the potential role of animals as a possible contributor of contamination.

One can presume that isolation of such multidrug-resistant bacteria in such an environment may be in part due to the uncontrolled use of antimicrobial agents, either in the food chain or to treat both humans and animals. Thus, this phenomenon could constitute a selective pressure for

New Microbes and New Infections © 2015 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)
http://dx.doi.org/10.1016/j.nmni.2015.11.010

environmental bacteria, which then consequently makes the environment a potential reservoir for antibiotic resistance genes [10]. Therefore, appropriate strategies should be implemented to avoid excessive use of antimicrobial agents and to limit environmental contamination with multidrug-resistant bacteria.

Acknowledgements

The authors thank the Lebanese University and the National Council for Scientific Research, Lebanon, for their funding of this research.

Conflict of Interest

None declared.

References

[1] Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev 2008;21:538–82.

[2] Rafei R, Hamze M, Pailhoriès H, Eveillard M, Marsollier L, Joly-Guillou M-L, et al. Extrahuman epidemiology of *Acinetobacter baumannii* in Lebanon. Appl Environ Microbiol 2015;81:2359–67.

[3] Wang B, Sun D. Detection of NDM-1 carbapenemase-producing *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter junii* in environmental samples from livestock farms. J Antimicrob Chemother 2015;70:611–3.

[4] Joly-Guillou ML. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. Clin Microbiol Infect 2005;11:868–73.

[5] Li P, Yang C, Xie J, Liu N, Wang H, Zhang L, et al. *Acinetobacter calcoaceticus* from a fatal case of pneumonia harboring blaNDM-1 on a widely distributed plasmid. BMC Infect Dis 2015;15:131.

[6] Kempf M, Rolain JM. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. Int J Antimicrob Agents 2012;39:105–14.

[7] Merino M, Acosta J, Poza M, Sanz F, Beceiro A, Chaves F, et al. OXA-24 carbapenemase gene flanked by XerC/XerD-like recombination sites in different plasmids from different *Acinetobacter* species isolated during a nosocomial outbreak. Antimicrob Agents Chemother 2010;54:2724–7.

[8] Fernández-Cuenca F, Rodríguez-Martínez JM, Gómez-Sánchez MAC, de Alba PD, Infante-Martínez V, Pascual A. Production of a plasmid-encoded OXA-72 β-lactamase associated with resistance to carbapenems in a clinical isolate *Acinetobacter junii*. Int J Antimicrob Agents 2012;39:93–4.

[9] Montealegre MC, Maya JJ, Correa A, Espinal P, Mojica MF, Ruiz SJ, et al. First Identification of OXA-72 carbapenemase from *Acinetobacter pittii* in Colombia. Antimicrob Agents Chemother 2012;56:3996–8.

[10] Roca I, Akova M, Baquero F, Carlet J, Cavaleri M, Coenen S, et al. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. New Microbes New Infect 2015;6:22–9.

New Microbes and New Infections © 2015 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, *NMNI*, **9**, 11–12
This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

4. Commentaires

Dans ce travail, nous avons réalisé l'une des plus grandes études épidémiologiques investiguant l'écologie d'*Acinetobacter* spp en dehors des hôpitaux. Ainsi, 2361 échantillons obtenus de plusieurs niches écologiques ont été étudiés.

Acinetobacter spp ont été identifiés dans environ 14% (88/641) des prélèvements de l'environnement dont 64 souches isolées des sols (18.8%) et 24 d'eau (8%). Ces résultats étaient légèrement différents de ceux obtenus d'une étude précédante réalisée au Liban dont la prévalence d' *Acinetobacter* spp était de l'ordre de 18% (Rafei *et al.*, 2015a). L'identification par séquençage du gène *rpo*B a montré une diversité des espèces avec *A.pittii* étant l'espèce la plus communément détectée (34% des souches environnementales), alors qu'uniquement 12 souches d'*A.baumannii* (13.6%) ont été isolées surtout des sols.

Parmi les 100 échantillons de végétaux consommables analysés, 30 étaient positifs pour *Acinetobacter* spp et *A.guillouaie* et *A.bereziniae* étaient les espèces prépondérantes. En outre, nous avons rapporté pour la première fois au Liban, la détection de deux souches d'*A.calcoaceticus* résistantes aux carbapénèmes et isolées des végétaux. Ces résultats peuvent mettre en évidence une contamination probable de l'evironnement entourant la zone d'agriculture telle que l'eau utilisée pour l'irrigation et le sol ou une contamination d'origine animale. En outre, une prévalence de 5.2 % a été retrouvée dans les prélèvements de lait, ce qui était légèrement supérieur à celle rapportée par Rafei *et al.*, qui ont pu isoler uniquement une souche d'*A.baumannii* parmi les 37 échantillons testés. Enfin, la faible prévalence d'*Acinetobacter* spp (1.4 %) dans les poissons peut s'expliquer par le fait que ces derniers n'ont pas été collectés directement des rivières, où les conditions sont plus favorables pour la croissance de ces bactéries.

D'autre part, 424 échantillons animaux ont été analysés. *Acinetobacter* spp ont été détectés chez 9% des animaux (21/230) que ce soit dans leur flore buccale, intestinale ou dans les deux types de prélèvements de façon concomitante. Dans cette étude, les chevaux, colonisés surtout par *A.gandensis*, avaient un taux de portage (23%) plus élevé que les autres animaux (environ 8%). Par ailleurs, *A.baumannii* et *A.pittii* ont été rarement détectés alors qu'ils étaient prépondérants chez les animaux investigués dans l'étude précédente (Rafei *et al.*, 2015a).

Au Liban, la recherche d'une potentielle colonisation cutanée par *Acinetobacter* spp n'a jamais été realisée. Nous avons étudié 4 groupes d'individus vivant dans des conditions

différentes. Parmi les participants, uniquement 3.4% (13/377) dont 11 étudiants de l'université et deux infirmiers ont été colonisés. Ce taux est inférieur à celui déjà rapporté dans la littérature (Al Atrouni *et al.*, 2016c), probablement en raison du moindre nombre de sites anatomiques investigués. *A.baumannii* n'a pas été détecté en portage alors qu'*A.schindleri* était l'espèce la plus commune.

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a montré que toutes les souches étaient sensibles aux carbapénèmes à l'exception des deux souches d'*A.calcoaceticus* isolées des végétaux. Toutefois, des souches résistantes aux ceftazidim, Ticarcillin, Ticarcillin+ acide clavulanique et piperacillin + tazobactam ont été détectées.

L'étude de la population réalisée par la méthode de référence qu'est la MLST a révélé la présence chez les 15 d'*A.baumannii* de 14 STs différents dont 10 ont été décrits pour la première fois ici. Ceci reflète une grande diversité des souches présentes à l'extérieur des hôpitaux, que ce soit dans l'environnement ou chez les animaux, à l'inverse de ce qui est observé en milieu hospitalier où certaines lignées clonales sont plus fréquemment retrouvées.

En conclusion, ce travail montre des résultats intéressants en ce qui concerne l'épidémiologie d'*Acinetobacter* au niveau extrahospitalier et souligne le rôle de l'environnement et les animaux comme réservoirs potentiels d'*A.baumannii*, l'espèce la plus impliquée en pathologie humaine. Les hypothèses de transmission à l'homme ne peuvent pas être exclues malgré le fait que les souches d'*A.baumannii* isolées n'étaient pas nombreuses et que les clones identifiés étaient différents de ceux rencontrés dans les hôpitaux (étude 1 dans la thèse et les études de Rafei *et al.* en 2015). Ainsi, la présence de ces STs doit être recherchée dans des études ultérieures notamment dans les infections communautaires. De même, il serait intéressant d'explorer plus les potentielles transmissions de la bactérie entre les animaux porteurs, leurs propriétaires, et leur environnement (domicile).

III. Caractérisation d'une putative nouvelle espèce d'*Acinetobacter*

1. Introduction

Acinetobacter, appartenant phylogénétiquement à la famille de *Moraxellaceae*, est un genre très hétérogène sur le plan physiologique, métabolique et écologique (Touchon *et al.*, 2014). En effet, selon la dernière classification taxonomique (Décembre 2016), ce genre comprend 53 espèces avec des noms validés et publiés. Ces différentes espèces ont été décrites de plusieurs sources y compris l'homme, l'environnement, et les animaux (http://apps.szu.cz/anemec/Classification.pdf).

Dans le cadre d'une étude visant à investiguer l'épidémiologie extrahospitalière d'*A.baumannii* au Liban, Rafei *et al.* ont rapporté l'isolement, à partir des animaux d'élevage, de plusieurs souches d'*Acinetobacter* non identifiées au rang d'espèce par le séquençage partiel du gène *rpo*B (Rafei *et al.*, 2015a). Le but de ce travail était de caractériser ces souches en utilisant d'autres techniques phénotypiques et génotypiques y compris le séquençage du génome complet. En outre, d'autres souches isolées de l'environnement (sol et eau) en Turquie, République de la Tchèque et Indonésie ont été également incluses dans cette étude.

2. Article 5: Proposal of *Acinetobacter libanensis* sp.nov,. a novel geographically widespread species isolated from livestock animals and found in soil and water ecosystems

Ahmad Al Atrouni[1, 3], Lenka Radolfova-Krizova[2], Rayane Rafei[3], Martina Maixnerova[2], David Goudenege, Mathieu Eveillard[1], Monzer Hamze[3], Marie Kempf[1], Alexandr Nemec[2]*

[1] ATOMycA, Inserm Atip-Avenir Team, CRCNA, Inserm U892, 6299 CNRS, University of Angers, France

[2] Laboratory of Bacterial Genetics, National Institute of Public Health, Šrob_arova 48, 100 42 Prague, Czech Republic

[3] Laboratoire Microbiologie Santé et Environnement (LMSE), Ecole Doctorale des Sciences

et de Technologie et Faculté de Santé Publique, Université Libanaise, Tripoli, Liban

**** Corresponding author***

Email: alexandr.nemec@szu.cz

Acinetobacter spp, belonging to the *Moraxellaceae* family are ubiquitous gram negative and non-fermenting coccobacilli, non- motile, strictly aerobic, oxidase-negative ,catalase-positive, and have the ability to occupy several ecological niches including humans, environment and animals (Vaneechoutte *et al.*, 2011). Interestingly, in the last decades several novel species have been described from soil, water and activated sludge samples, but also from cattle and horse (Al Atrouni *et al.*, 2016). Thus, as of 4 March 2017, the formal classification of the genus *Acinetobacter* comprises 53 validly published species names (http://apps.szu.cz/anemec/Classification.pdf) including two pairs of synonyms. Recently, during the investigation of the extra human epidemiology of *A.baumannii* in Lebanon, Rafei *et al*. reported the isolation of twelve *Acinetobacter* strains that were distinct from all known species and taxa of the genus as assigned by partial *rpo*B gene sequencing (Rafei *et al.*, 2015). These strains were recovered from the faeces of livestock animals in the region of Akkar (North of Lebanon). Four other strains were isolated, two from mud samples (Letařovice, Czech Republic), one from soil sample (Sumatra, Indonesia) and one from river water (Eufrat, Turkey) (Table 1). The aim of the present study was to define the taxonomic status of these isolates using polyphasic approach.

All strains were obtained using selective culture in a minimal mineral medium supplemented with 0.1% (w/v) sodium acetate as described by Krizova *et al.* (2014). The distinctness of the Lebanese isolates at the strain level was confirmed by Pulsed Gel Field Electrophoresis using the enzyme *Apa1*. The representatives of all *Acinetobacter* species with validly published names (except for *Acinetobacter grimontii* and *Acinetobacter pakistanensis* which are considered to be the later synonyms of *Acinetobacter junii* and *Acinetobacter bohemicus*, respectively; Nemec & Radolfova-Krizova, 2016; Touchon *et al.*, 2014) and of several provisional taxa were included for comparative phenotypic and genotypic analyses.

All strains had basic properties congruent with the description of the genus *Acinetobacter*,

(Baumann *et al.*, 1968) i.e. they were oxidase-negative, catalase-positive, non-motile and strictly aerobic Gram-stain-negative organisms. Oxidase activity was tested using OXItest strips (Erba Lachema). Catalase activity was determined by assessing bubble production by cells in 3% (v/v) hydrogen peroxide solution. Motility was assessed in soft agar medium (10 g tryptone, 5 g NaCl and 4 g agar per litre). The capacity for anaerobic growth was assayed on tryptic soy agar (Oxoid) supplemented with and without 0.2% (w/v) KNO3 using an anaerostat with the AnaeroGen system (Oxoid). Nitrate reduction was tested using the API 20 NE system (bioMerieux). Gram-staining was performed with the Hucker method as described by Gerhardt *et al.*(1981). Tests were read/performed after 1 day (oxidase, catalase, Gram-staining, nitrate reduction) or 3 days (the other tests) of culture at 30 °C. The control strains used were *Acinetobacter baumannii* CIP 70.34T, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

In order to define the taxonomic position of this group, we have started to perform comparative analyses based on the partial sequences of three housekeeping genes (*rpo*B, *gyr*B and *16S rRNA*), the whole-cell patterns obtained by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) MS, the metabolic and the physiological features of all strains of a putative novel taxon. A formal species name is then proposed only for a phylogenetically distinctive group which encompasses multiple strains of diverse origin (Christensen *et al.*, 2001) and which is both genotypically and phenotypically internally coherent and, at the same time, different from known taxa at the species level of resolution.

The *16S rRNA* gene sequences of all strains were obtained using the external PCR and sequencing primers Ac8-F and Ac1542-R, targeting the region corresponding to positions 28–1521 in the E. coli numbering system (accession no. J01695.2), in addition to the internal sequencing primers Ac703-F and Ac820-R, as described previously (Krizova *et al.*, 2015). Cluster analysis was performed for a region of 1459 bp corresponding to positions 52-1510 of

the *E. coli* sequence (J01695.2) using the calculation parameters described previously (Nemec *et al.*, 2011). As results, the strains formed a distinct, well supported cluster within the genus. The intrataxon sequence similarity (percentages of identical nucleotides at the corresponding positions) was ≥ 99.5%, whereas the pairwise similarity values between the sequences of these strains and the other *Acinetobacter* sequences were in the range of 94.7% (*A. nectaris* CIP 110549^T) to 98.4% (*A. haemolyticus* CIP 64.3^T).

Comparative sequence analysis of the *rpo*B (RNA polymerase B-sub-unit) gene which is a good phylogenetic marker for the genus *Acinetobacter* was carried out for an 861 bp region which corresponds to nucleotide positions 2915–3775 of the *rpo*B coding region of *A.baumannii* CIP 70.34T (accession no. APRG00000000) as described previously (Nemec *et al.*, 2011). The *rpo*B gene sequences of the strains formed an internally cohesive cluster separated from the known *Acinetobacter* spp. The similarity values between these sequences ranged from 96.5 to 100 %, whereas those between them and representatives of the other species ranged from 77.7 % (*A. qingfengensis* ANC 4671^T) to 90.4% (*A. gandensis* ANC 4275^T).

Analysis of the *gyr*B (DNA gyrase subunit B) gene was performed as described before (Radolfova-Krizova *et al.*, 2016) using the novel set of amplification and sequencing primers gyrB28-F2 and gyrB28-R which flank the region encompassing positions 293–1252 of the *gyr*B coding sequence of *A.baumannii* CIP 70.34T(accession no. APRG01000002.1). Genus-wide similarity calculations and cluster analysis were then carried out for an 810 bp region corresponding to *gyr*B positions 384-1193 of *A.baumannii* CIP 70.34^T. The *gyr*B gene sequences of the strains again created a well-supported and distinct cluster within the genus. The similarity values between these strains were 95.8- 100%, in contrast to the range of 73.2% (*A. boissieri* ANC 4422^T) to 85.3% (*A. gandensis* ANC 4275^T) found between them and the other species.

Analysis of the strains in the context of the genus was based on whole-cell profiling by MALDI-TOF MS. Samples were prepared according to the Bruker Daltonics instructions as follows: colonies of a bacterial strain grown overnight on sheep blood agar (Oxoid) at 25 or 30 °C (depending on the growth requirements of the strain) were smeared directly onto 24 spots of the MALDI sample plate and, after drying at room temperature, overlaid with 1 µl of the saturated a-cyano-4-hydroxycinnamic acid solution in an acetonitrile/water/trifluoroacetic acid (50 : 47.5 : 2.5, by vol.) mixture. MALDI-TOF mass spectra measurements were performed using a Microflex LT instrument (Bruker Daltonics) operated in linear positive mode at an acceleration voltage of 19.9 kV in the mass range from 2 to 20 kDa under control of the FlexControl 3.4 software (Bruker Daltonics). External calibration of the mass spectra was performed using E. coli DH5a peaks (4346.3, 5095.8, 5380.4, 6254.4, 7273.5 and 10299.1 Da). Twenty-four independent mass spectra comprising at least 100 laser shots each (10 laser shots at 10 different spot positions) were collected and averaged for each sample. They were further processed and unified to a main spectrum under default settings of the BioTyper software (version 3.1; Bruker Daltonics). Main spectra were determined for the novel strains and the type and reference strains of all *Acinetobacter* species with validly published or provisional names. Based on cluster analysis of these spectra, the strains formed a compact cluster clearly separated from all the other strains.

In order to assess the metabolic and physiological features of the strains, a set of standardized tests, mostly carbon source assimilation was applied as described before (Nemec *et al.*, 2009) Table2 shows the results for these strains and all *Acinetobacter* species with validly published names (except for *A. boissieri* and *A. nectaris* which are metabolically unique, e.g. in terms of their ability to utilize sucrose and D-fructose but not acetate; Álvarez-Pérez *et al.*, 2013), each of which was, whenever possible, represented by multiple reference strains. The strains of the

novel group are metabolically less active and importantly, there are no distinctive clear-cut traits which differentiate this group from these species.

Description of *Acinetobacter libanensis* sp. nov. (proposal)

The phenotypic characteristics correspond to those of the genus (Baumann *et al.*, 1968), i.e. Gram-stain-negative, strictly aerobic, oxidase-negative and catalase-positive coccobacilli typically occurring in pairs, incapable of swimming motility, capable of growing in mineral media with acetate as the sole carbon source and ammonia as the sole source of nitrogen and incapable of dissimilative denitrification. Positive in the transformation assay of Juni (1972). Colonies on tryptic soy agar (Oxoid) after 24 h of incubation at 30 °C are approximately 1.5mm in diameter, grey–white, slightly opaque, circular, convex and smooth, with entire margins.

Growth occurs in brain-heart infusion broth (Oxoid) at temperatures ranging from 15 to 33 °C. Acid is not produced from D-glucose. Gelatin is not hydrolysed. Haemolysis is not observed on agar media supplemented with sheep erythrocytes. Acetate, benzoate, ethanol, and DL-lactate are utilized as sole sources of carbon, with growth visible within 6 days (mostly 2 days) of culture at 30 °C. Various numbers of strains utilize 2,3-butanediol, Citrate (Simmons), L-Glutamate, Glutarate, L-histidine D-Malate, phenylacetate and tricarballylate, whereas no growth on trans –Aconitate, Adipate, β-Alanine, 4-Aminobutyrate, L-Arabinose, L-Arginine, L-Aspartate, Azelate, Citraconate,Gentisate, Histamine, 4-Hydroxybenzoate, L-Leucine, Malonate, L-Ornithine, L-Phenylalanine, Putrescine, D-Ribose, L-Tartrate, Trigonelline andTryptamine.

Remaining experiences to complete the study

The taxonomic position of the novel group will finally be assessed by genome-wide comparative analysis. Based on phenotypic and molecular data, one strain will be selected to represent the group and will be sequenced using the Illumina Miseq approach. The resulting

genome sequence will be compared to those representing nearly all known *Acinetobacter* species using the average nucleotide identity based on BLAST (ANIb) and digital DNA–DNA hybridization (dDDH) parameters.

Table 1: Strains of *Acinetobacter libanensis*

Strain Designation	Specimen	Locality
ANC 5595	**Stool, a cow**	**Akkar, North of Lebanon (farm 1-Tal Abbass)**
ANC 5597	**Stool, a cow**	**Akkar, North of Lebanon (farm 1- Daher El Kanbar)**
ANC 5598	**Stool, a cow**	**Akkar, North of Lebanon (farm 1-Daher El Kanbar)**
ANC 5599	**Stool, a cow**	**Akkar, North of Lebanon (farm 1-Daher El Kanbar)**
ANC 5600	**Stool, a cow**	**Akkar, North of Lebanon, EL HISSA**
ANC 5601	**Stool, a cow**	**Akkar, North of Lebanon, EL HISSA**
ANC 5602	**Stool, a cow**	**Akkar, North of Lebanon, EL HISSA**
ANC 5604	**Stool, a sheep**	**Akkar, North of Lebanon, (EL KNAYSSE, fARM 2)**
ANC 5605	**Stool, a goose**	**Akkar, North of Lebanon, (EL KNAYSSE, fARM 2)**
ANC 5607	**Stool, a sheep**	**Akkar, North of Lebanon, (EL KNAYSSE, fARM 2)**
ANC 5608	**Stool, a cow**	**Akkar, North of Lebanon, (EL KNAYSSE, fARM 2)**
ANC 5609	**Stool, a cow**	**Akkar, North of Lebanon, (EL KNAYSSE, fARM 2)**
ANC 4945	**Soil, a tropical forest**	**Sumatra, Indonesia**
ANC 5033	**River water**	**Eufrat, Birecik, Turkey**
ANC 5581	**Mud, a creek bank**	**Letařovice, Czech Republic**
ANC 5579	**Mud, a creek bank**	**Letařovice, Czech Republic**

Table 2. Metabolic and physiological features of the novel species and *Acinetobacter* species with validly published names.

Characteristic	Taxon 36	A. albensis	A. apis	A. baumannii	A. baylyi	A. beijerinckii	A. berezniae	A. bohemicus	A. bouvetii	A. brisouii	A. calcoaceticus	A. celticus	A. courvalinii	A. dispersus	A. equi	A. gandensis	A. gerneri	A. guangdongensis	A. guillouiae	A. gyllenbergii	A. haemolyticus	A. harbinensis	A. indicus	A. johnsonii	A. junii	A. kookii	A. lwoffii	A. modestus	A. nosocomialis	A. parvus	A. pittii	A. populi	A. pragensis	A. proteolyticus	A. puyangensis	A. qingfengensis	A. radioresistens	A. rudis	A. schindleri	A. seifertii	A. soli	A. tandoii	A. tjernbergiae	A. towneri	A. ursingii	A. variabilis	A. venetianus	A. vivianii
Number of strains	16	8	1	25	5	15	16	25	1	1	11	6	9	9	5	6	1	1	17	9	16	1	2	30	14	1	16	7	20	10	20	3	7	6	2	2	12	3	22	16	5	1	2	2	29	16	5	9
Growth at 44 °C	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	95 (+)	-	10 (-)	-	-	-	-	-	-	-	-	13 (-)	-	-	-	-	-	31W (W)	-	-
Growth at 41 °C		-	-	+	60 (-)	-	-	-	-	-	9 (-)	-	50W (D)	-	D	-	-	+	-	-	94 (+)	-	+	-	93 (+)	+	6 (-)	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	94 (+)	80 (+)	-	-	+	-	+	-	-
Growth at 37 °C	+	-	-	+	+	+	+	-	D	+	91 (-)	-	+	+	+	+	+	+	D	+	+	-	+	10W (D)	+	+	+	+ (W)	+	90 (+)	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Growth at 35 °C	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Growth at 32 °C		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acidification of D-glucose	-	-	+	+	+	-	88 (+)	-	-	-	91 (-)	-	+	-	-	-	+	-	-	-	75 (+)	-	-	-	-	-	19 (-)	-	+	-	95 (+)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	13 (-)	-	89 (+)
Hemolysis of sheep blood	-	-	-	-	-	+	-	80W (W)	-	-	-	-	89 (+)	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	60W (-)	50 (-)	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	60 (+)	-	+	-	-	-	+	+
Liquefaction of gelatin	-	-	-	-	-	13 (-)	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	94 (+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	80 (+)	-
Acetate	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
trans-Aconitate	-	-	-	92 (+)	+	-	38 (-)	-	-	+	+	-	44 (-)	11 (-)	-	-	-	-	12 (-)	-	63 (+)	-	-	-	-	-	6 (-)	-	60 (+)	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	6 (-)	-	56 (-)
Adipate	-	88 (+)	-	88 (+)	+	-	63 (+)	-	-	-	+	-	+	22 (-)	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	81 (+)	14 (-)	95 (+)	-	+	33	-	67 (-)	-	-	+	-	41 (-)	63 (-)	+	-	-	-	+	69 (-)	20 (-)	89 (+)
β-Alanine	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	91 (-)	-	89 (+)	+	-	-	+	-	94 (+)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	85 (+)	-	90 (+)	-	-	+	-	-	+	-	-	88 (-)	-	-	-	-	-	-	-	+
4-Aminobutyrate	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	88 (D)	D	+	-	-	83 (+)	86 (+)	+	88 (+)	-	+	-	+	+	-	D (-)	50 (-)	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	19 (-)	+	+
L-Arabinose	-	-	-	84 (+)	-	-	-	-	-	-	27 (-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	85 (+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	19 (-)	-	-
L-Arginine	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	94 (+)	-	-	83 (+)	93 (+)	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	83 (+)	-	-	+	+	+	50 (+)	-	-	19 (-)	+	+
L-Aspartate	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	11 (-)	-	+	-	D	-	+	-	31 (-)	-	-	83 (+)	21 (+)	-	-	-	+	-	+	+	-	-	50 (-)	50 (-)	-	-	-	+	+	+	-	-	97W (+)	-	-	11 (D)
Azelate	-	88 (+)	-	88 (+)	+	-	63 (+)	-	-	-	+	-	+	22 (-)	-	-	+	-	+	+	-	-	50 (-)	-	-	-	+	-	95 (+)	-	+	-	-	67 (-)	-	-	+	-	64 (-)	63 (-)	+	-	-	-	+	81 (+)	20 (-)	89 (+)
Benzoate	+	D (+)	-	84 (+)	+	-	+	92 (+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	88 (+)	+	-	+	50 (+)	97 (+)	79 (+)	+	88 (+)	+	90 (+)	-	90 (+)	-	+	+	D	-	+	+	91 (+)	94 (+)	+	+	-	+	52 (-)	88 (+)	+	+
2,3-Butanediol	19	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	33 (-)	+	-	+	-	-	-	-	67 (-)	-	+	6 (-)	14 (-)	90 (+)	-	85 (+)	+	29 (+)	-	+	+	+	+	32 (-)	+	+	+	-	50 (-)	-	81 (+)	-	-
Citraconate	-	-	-	40 (+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrate (Simmons)	56	+	+	+	+	+	+	-	+	+	91 (D)	-	+	+	+	50 (+)	+	-	+	+	75 (+)	-	-	90 (-)	79 (+)	-	13 (-)	-	+	-	+	-	+	+	-	50 (-)	-	+	59W (+)	+	+	+	-	-	+	25 (-)	+	+
Ethanol	+	-	-	96 (+)	+	+	+	+	+	+	91 (+)	+	-	11 (-)	80	+	+	+	+	22 (-)	94 (+)	+	+	+	93 (+)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	95 (+)	+	+	+	+	+	+	+	-
Gentisate	-	50 (+)	-	4 (-)	-	-	-	4 (-)	-	-	-	-	-	33 (-)	+	-	-	-	18 (-)	11 (+)	81 (+)	-	-	-	-	-	-	-	10 (-)	-	25 (-)	-	43 (+)	+	-	-	-	-	41 (+)	75 (+)	-	-	-	-	-	-	-	89 (+)
D-Gluconate	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Glucose	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Glutamate	50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	33 (+)	+	+	+	+	+	-	50 (+)	+	+	-	6 (-)	+	+	-	+	+	86 (D)	+	+	+	+	+	- (D)	+	+	+	50 (+)	+	25 (-)	+	+
Glutarate	88	-	-	96 (+)	D	-	+	-	+	+	91 (D)	-	+	+	-	83 (+)	+	+	+	D (-)	-	-	-	-	-	-	-	-	95 (+)	-	90 (+)	+	+	33 (-)	50 (+)	-	+	+	95 (+)	+	+	-	-	-	97 (+)	19 (-)	-	89 (+)
Histamine	-	-	-	-	-	-	63 (+)	-	-	-	-	-	11 (-)	-	-	-	-	-	65 (+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Histidine	25	-	-	96 (+)	-	+	94 (+)	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	94 (+)	+	+	-	-	-	93 (+)	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
4-Hydroxybenzoate	-	88 (+)	-	92 (+)	+	-	88 (+)	92 (+)	-	+	91 (+)	-	+	+	+	-	+	-	88 (+)	89 (+)	81 (+)	-	-	20 (-)	-	-	-	-	80 (+)	-	+	-	+	+	+	+	+	+	64 (+)	94 (+)	+	+	-	-	97 (+)	-	-	+
DL-Lactate	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	93 (+)	+	89 (+)	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	6 (-)	-	+
L-Leucine	-	-	-	88 (+)	-	93 (+)	-	-	-	-	91 (-)	-	+	+	-	-	-	-	-	+	88 (+)	-	-	-	14 (-)	-	-	-	95 (+)	-	95 (+)	-	-	83 (-)	-	-	92 (+)	+	-	94 (-)	-	+	-	-	-	-	+	+
Levulinate	-	-	-	24 (-)	-	-	-	-	-	-	91 (-)	50 (-)	11 (-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5 (-)	-	5 (-)	-	-	-	-	-	-	-	-	6 (-)	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Malate	6	38W (W)	-	92 (+)	D (+)	+	88 (+)	D	-	+	D (-)	-	89 (+)	+	-	-	-	+	94 (+)	+	88 (+)	-	-	10W (-)	79 (D)	-	19W (-)	D	+	-	95 (+)	67	-	+	-	-	-	95W (+)	88 (+)	80 (D)	+	-	50 (-)	+W	13 (+)	+	+
Malonate	-	+	-	88 (+)	+	+	-	+	-	+	+	+	+	22 (-)	-	17 (-)	-	-	18 (-)	78 (+)	-	+	-	73 (-)	-	-	6 (-)	-	20 (+)	-	95 (+)	-	+	67 (+)	-	+W	+	+	-	75 (+)	+	+	-	-	-	-	+	+
L-Ornithine	-	-	-	76 (-)	-	-	-	-	-	-	+	+	89 (+)	89 (D)	-	-	-	-	-	56 (+)	-	-	-	-	-	-	-	-	95 (+)	20 (-)	95 (+)	-	-	+	-	-	-	-	81 (-)	-	+	-	-	-	-	-	+
Phenylacetate	63	-	-	84 (+)	-	-	25 (-)	-	-	+	+	67 (+)	+	89 (+)	-	-	+	+	65 (+)	+	-	-	+	-	-	+	69 (+)	-	85 (+)	-	75 (+)	33	71 (+)	83 (-)	-	-	+	+	-	88 (+)	+	+	-	-	-	75 (+)	-	+
L-Phenylalanine	-	-	-	84 (+)	-	-	-	-	-	-	+	-	+	89 (+)	-	-	+	-	-	89 (+)	-	-	-	-	-	-	-	-	85 (+)	-	75 (+)	-	-	+	-	-	92 (+)	+	-	88 (+)	+	+	-	-	-	38 (-)	-	+
Putrescine	-	-	-	96 (+)	-	-	-	-	-	D	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	95 (+)	-	+	-	-	-	-	-	92 (+)	-	-	81 (-)	-	+	-	-	-	-	78 (+)
D-Ribose	-	-	-	76 (+)	-	-	-	-	-	-	45 (-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	80 (+)	-	35 (-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13 (-)	-	22 (+)
L-Tartrate	-	-	-	32 (-)	-	-	-	16 (-)	-	+	9 (-)	-	22 (-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	37 (-)	-	-	-	-	-	-	85 (+)	-	+	-	-	-	-	18 (-)	31 (+)	20 (-)	+	-	-	-	-	-	-	-
Tricarballylate	69	+	-	92 (+)	80 (+)	-	38 (-)	4 (-)	-	+	+	-	44 (-)	11 (-)	80	-	-	-	12 (-)	-	-	-	-	-	-	-	6 (-)	-	95 (+)	-	+	-	71 (-)	+	-	-	-	45 (+)	+	+	+	-	-	-	-	-	56 (-)
Trigonelline	-	-	-	60 (+)	+	-	+	-	-	-	9 (-)	-	67 (+)	-	-	-	-	-	59 (-)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	20 (-)	-	20 (+)	-	-	-	50 (-)	+	-	-	-	+	-	50 (+)	-	-	-	-	-	+
Tryptamine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	22 (D)	11 (+)	-	-	+	-	82 (+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	57 (-)	50 (+)	-	-	+	-	6 (-)	-	-	-	-	-	-	-	-	D
No. of differences*		4 (4)	8 (1)	5 (11)	12	6 (2)	4 (3)	5 (3)	0	9	10 (5)	3 (1)	11 (4)	8 (2)	4 (1)	0	9	0	3 (4)	7 (3)	4 (6)	2 (1)	0 (1)	0 (5)	0 (3)	1 (1)	1 (3)	4 (1)	5 (10)	2 (1)	8 (8)	4	4	9 (1)	1	4 (1)	4 (4)	5	0 (1)	5 (7)	13	11 (1)	4 (1)	0 (1)	2 (3)	0 (1)	6 (2)	11 (3)

* Number of differences in individual characters between Taxon 36 and another species. Only the homogeneous characters (i.e. those which were either positive or negative in all strains of a species) are considered (highlighted in yellow). In addition, the number of characters for which the difference in the percentages of positivity between two species is ≥75% is indicated in parentheses. Of the temperature growth tests, only the test at 37°C was taken into account.

For strain-dependent reactions, results for type strains are given in parentheses.

Discussion générale

A.baumannii est une bactérie Gram négatif opportuniste associée à des infections nosocomiales et communautaires, notamment chez les patients immunodéprimés (Kempf and Rolain, 2012; McConnell *et al.*, 2013). Le nombre des souches multi-résistantes aux antibiotiques, notamment aux carbapénèmes, n'a cessé d'augmenter ces dernières années, alors que ces molécules étaient considérées il y a encore peu de temps comme traitement de choix (Magiorakos *et al.*, 2012; Reddy *et al.*, 2010). Ainsi, du fait de la capacité remarquable d'acquérir des déterminants de la résistance, de résister à la dessiccation et de survivre sur les surfaces inanimées, *A.baumannii* a été impliqué dans des épidémies de grande ampleur (Peleg *et al.*, 2008).

La compréhension des caractéristiques moléculaires des souches est une stratégie clé pour suivre les épidémies et contrôler la diffusion d'*A.baumannii* aussi bien dans les hôpitaux que dans la communauté. (Rafei *et al.*, 2014b). Ainsi, alors que l'épidémiologie hospitalière de cette bactérie est relativement bien comprise, celle extrahospitalière reste encore une énigme, même si des études en dehors d'un contexte infectieux ont été réalisées (Berlau *et al.*, 1999a; Seifert *et al.*, 1997; Towner, 2009). Par conséquent, une meilleure connaissance des réservoirs communautaires semble indispensable pour mieux cerner l'épidémiologie globale de la bactérie, et pour mieux comprendre ses interactions avec l'hôte. Dans notre travail, le but était d'essayer d'apporter des éléments de réponse en étudiant l'épidémiologie et l'écologie d'*Acinetobacter* spp au Liban.

Axe 1 : Quelle est l'épidémiologie moléculaire d'*A.baumannii* circulant dans les hôpitaux au Liban au cours de ces dernières années ? Les clones identifiés sont-ils identiques à ceux identifiés mondialement et dans des études précédentes, ou ont-ils une distribution particulière ?

Au Liban, les premières données épidémiologiques d'*A.baumannii* étaient limitées sur l'étude de quelques souches résistantes aux carbapénèmes isolées à Beyrouth où des épidémies associées aux trois clones internationaux ont été décrites entre 2004 et 2007 (Di Popolo *et al.*, 2011; Zarrilli *et al.*, 2008). Des études avancées ont commencé avec les travaux de Rafei *et al.*

en 2014, qui ont comparé l'efficacité de quatre méthodes de typage sur une collection de 42 souches isolées à Beyrouth et Tripoli. (Rafei *et al.*, 2014c). Dans une étude ultérieure, ce même groupe a rapporté la prédominance à Tripoli, des souches appartenant au clone international 2 et portant le variant OXA-66 du gène *bla*$_{\text{OXA-51}}$ (Rafei *et al.*, 2015b). Afin de dresser un portrait de l'épidemiologie moléculaire d'*A.baumannii* au cours de ces dernières années, nous avons étudié 119 souches isolées entre 2013 et 2015 par MLST et PFGE.

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a montré que 76.5 % des souches analysées étaient résistantes aux carbapénèmes. Récemment, Dahdouh *et al.* ont rapporté une prévalence de 90% sur 90 souches isolées des patients libanais (Dahdouh *et al.*, 2016). Toutefois, ces taux ne représentent pas la prévalence réelle de la résistance chez *A.baumannii* au Liban, mais ils étaient concordants avec les résultats de l'étude rétrospective nationale réalisée par la société Libanaise des maladies infectieuses qui a montré que le taux de résistance aux carbapénèmes chez *Acinetobacter* spp avait augmenté dramatiquement de 57.6% en 2011 à 84.5% en 2013 (Chamoun *et al.*, 2016). Des pourcentages élevés ont également été retrouvés dans d'autres pays : 66% en Syrie (Hamzeh *et al.*, 2012) ; 85% en Iran (Hojabri *et al.*, 2014) ; 70% en Egypte (Al-Agamy *et al.*, 2014) ; 69% en Arabie Saoudite (Al-Sultan *et al.*, 2015) ; 48% en Algérie (Bakour *et al.*, 2013) ; 47% en Tunisie (Ben Othman *et al.*, 2011) ; 57% en Grèce (Gogou *et al.*, 2011). Toutes ces observations montrent une situation alarmante qui est en partie le résultat d'une utilisation mal contrôlée des antibiotiques dans le traitement des infections.

L'un des principaux mécanismes sous-tendant cette résistance aux carbapénèmes est lié à l'acquisition et à la production des oxacillininases à activité de carbapénémase notamment l'OXA-23 (Potron *et al.*, 2015). En effet, des nombreuses épidémies hospitalières à *A.baumannii* multi-résistants et portant le gène *bla*$_{\text{OXA-23}}$ ont été décrites à travers le monde (Fouad *et al.*, 2013; Merino *et al.*, 2014; Principe *et al.*, 2014; Zowawi *et al.*, 2015). De façon similaire aux études précédantes (Dahdouh *et al.*, 2016; Rafei *et al.*, 2015b), nous avons trouvé que le gène codant pour cette carbapénémase était prédominant (83 souches) et semblait avoir une situation endémique à la fois à Tripoli et à Beyrouth. En outre, nous avons rapporté pour la première fois au Liban la coexistence chez une même souche de deux carbapénèmases (OXA-23 et OXA-24 ou OXA-58), et la présence du gène codant l'OXA-143 chez une autre souche. Enfin, après une première description chez des patients syriens rapatriés (Rafei *et al.*, 2014a), le gène NDM-1 a été détecté chez quatre souches dans notre étude.

L'étude de la structure de la population par MLST a révélé que 68% (81/119) des souches appartenaient au clone international 2, et particulièrement au ST2 qui semble largement distribué au Liban. Ces résultats sont concordants avec ceux de Rafei *et al.* et rejoignent également la situation mondiale (Karah *et al.*, 2012; Rafei *et al.*, 2015b; Zarrilli *et al.*, 2013). Par ailleurs, nous avons retrouvé un même clone (C)/ST2, distribué à la fois à Tripoli et à Beyrouth. Des résultats similaires ont été rapportés au Royaume-Uni où un même clone défini par PFGE a été reparti dans environ 60 hôpitaux, mais également au Liban où un cluster prédominant (A'/ST2) a regroupé des souches de plusieurs hôpitaux (Rafei *et al.*, 2014c; Turton *et al.*, 2009). Ainsi, ceci nous amène à nous demander si le clone identifié dans cette étude est similaire à celui de l'étude précédente, constituant un clone particulier et spécifique du Liban, ou s'il constitue un nouveau clone émergent dans ce pays.

Au-delà du clone international 2 regroupant le ST2 et ses variants, les clones internationaux 1 (CC1) et 7 (CC25) sont responsables des épidémies à *A.baumannii* et ont été décrits comme des clones émergents en Europe, Asie, Afrique, Amérique et Australie. Au Liban, des souches appartenant à ces clones et portant les gènes $bla_{\text{OXA-23}}$ et $bla_{\text{NDM-1}}$ ont été rapportées dans une étude précédente. Dans notre étude, le ST1 a été détecté chez une seule souche alors que le ST25 chez six souches dont uniquement une résistante aux carbapénèmes. Ceci peut mettre en évidence un rôle potentiel des hôpitaux comme un réservoir des déterminants de la résistance aux antibiotiques. Un autre clone émergent, le ST85, identifié pour la première fois en Grèce, puis en France, Espagne, Turquie et Liban, a été longtemps associé avec la carbapénémase NDM-1 (Bonnin *et al.*, 2013b; Decousser *et al.*, 2013; Gogou *et al.*, 2011; Heydari *et al.*, 2015; Mosqueda *et al.*, 2013; Rafei *et al.*, 2014a). Nous avons pu isoler trois souches appartenant à ce clone dont deux produisaient NDM-1 et une souche l'OXA-23. D'autre part, plusieurs ST sporadiquement rapportés chez des souches sensibles dans l'étude précédente (ST 103, ST154, ST46, ST6, ST284, ST150, ST108) n'ont pas été détectés dans notre étude et ont été remplacés par ST636 et le ST193. En outre, nous avons décrit pour la première fois 18 nouveaux STs. Ces résultats pourraient montrer que les souches qui n'appartiennent pas aux clones épidémiques sont incapables de persister en milieu hospitalier et supportent le fait que le génome d'*A.baumannii* est en évolution continue (Wright *et al.*, 2014).

Aujourd'hui, le développement des nouvelles méthodes d'identification performantes a permis de mettre en évidence le rôle des autres espèces du genre *Acinetobacter* dans les infections humaines notamment, *A.nosocomialis* et *A.pittii*, bien qu'elles soient souvent associées à des conséquences cliniques moins sévères (Chusri *et al.*, 2014). Nos travaux ont permis pour la première fois de décrire au Liban deux souches d'*A.pittii* résistantes aux carbapénèmes par production d'OXA-72 et de NDM-1.

Axe 2 : Quelle est l'écologie d'*Acinetobacter* spp au Liban ? Quelles sont les espèces qui circulent en dehors des hôpitaux ? Existe-t-il des clones déjà identifiés en pathologie ?

Dans le but de caractériser des potentiels réservoirs des souches circulant dans les hôpitaux, nous avons investigué diverses niches écologiques pour la présence d'*Acinetobacter* spp et particulièrement *A.baumannii*.

La présence des *Acinetobacter* dans l'environnement a été bien documentée. Ainsi, l'utilisation des techniques moléculaires a permis d'identifier les espèces de ce genre notamment dans les sols contaminés par les hydrocarbures, des eaux de source naturelle, des eaux usées, des boues actives et des sédiments. De même, plusieurs nouvelles espèces ont été décrites à partir des sites environnementaux (Al Atrouni *et al.*, 2016b). Dans cette étude, la prévalence de ces bactéries dans le sol était 18.8%, ce qui était similaire à celle retrouvée par Rafei *et al.* au Liban (17.6%) (Rafei *et al.*, 2015a) et significativement inférieure à celle retrouvée par Houang *et al.* en Hong Kong (37%). En outre, 8% des échantillons d'eau étaient positifs pour *Acinetobacter* spp, alors que le pourcentage était d'environ 18% dans l'étude précédente (Rafei *et al.*, 2015a). Il est à noter que dans la première étude, un nombre limité d'échantillons (124) a été collecté, principalement au Nord du Liban, alors que notre étude incluait 641 échantillons prélevés dans des régions différentes au Liban. Et comme la température et l'humidité ne sont pas suffisamment constantes, ces différences mettent en évidence un rôle potentiel des facteurs climatiques qui pourraient influencer la prévalence de ces bactéries dans l'environnement. Toutefois, ces observations sont à tempérer puisque nous n'avons pas pris en compte l'effet réel de la saison (période de collecte : automne et hiver) ainsi que les caractéristiques biochimiques des échantillons collectés. De façon remarquable, le sol et l'eau étaient des niches pour plusieurs espèces d'*Acinetobacter*, notamment *A.pittii* et *A.calcoaceticus*. Concernant *A.baumannii*, 12 souches ont été isolées surtout de zones polluées

(industrie, jardins publics, eau usée), alors que 5 souches ont été détectées précédemment, uniquement dans l'eau de puits ou l'eau de source (Rafei *et al.*, 2015a). L'étude par MLST des souches environnementales d'*A.baumannii* nous a permis d'identifier majoritairement une population constituée de 9 nouveaux STs. Parmi les STs déjà identifiés, nous avons identifié le ST271, qui a également été détecté chez des souches cliniques en Espagne (Donnée non publiée) (http://pubmlst.org/ abaumannii) et le ST350, qui a été détecté chez des souches animales en Suisse (Donnée non publiée) et plus récemment chez des souches cliniques résistantes aux carbapénèmes en Bulgarie (Pfeifer *et al.*, 2016). Cependant, nos observations n'étaient pas concordantes avec celles de Rafei *et al.* qui ont pu identifier dans l'environnement des STs (ST1, ST46, ST108) également retrouvés chez des patients libanais (Rafei *et al.*, 2015a) (figure 6). Les auteurs avaient suggéré que les infections étaient communautaires, ce qui ouvre des questions sur l'origine des souches et sur la capacité des interactions entre les différentes niches écologiques.

Bien que les *Acinetobacter* spp aient été fréquemment décrits dans l'environnement, leur présence chez les animaux a également été mise en évidence. En effet, plusieurs études ont rapporté exclusivement des cas d'infections chez des animaux hospitalisés comme des bactériémies, des infections de plaies, des abcès, des infections post-chirurgicales ou des infections urinaires (Black *et al.*, 2009; Boerlin *et al.*, 2001; Endimiani *et al.*, 2011). En outre, *Acinetobacter* spp et notamment *A.baumannii* ont également été isolés en état de portage chez les animaux (Al Atrouni *et al.*, 2016b; Hamouda *et al.*, 2011; Kempf *et al.*, 2012a). Dans notre étude, nous avons montré qu'approxamativement 9% des animaux étaient colonisés par *Acinetobacter* spp. Ce pourcentage était similaire à ceux rapportés sur l'Ile de la Réunion (6.5 % et 8.5%) (Belmonte *et al.*, 2014; Pailhoriès *et al.*, 2015b). Cependant, dans ces dernières études, les auteurs ont recherché chez les animaux de compagnie uniquement la présence d'*A.baumannii* alors qu'ici *A.baumannii*, *A.johnsonii*, *A.pittii* et *A.junii* ont été détectés chez ces animaux. Au Liban, Rafei *et al.* ont rapporté l'isolement de 110 souches d'*Acinetobacter* y compris 30 *A.baumannii* à partir des échantillons animaux analysés alors que dans nos travaux, nous avons isolé uniquement 22 souches (Rafei *et al.*, 2015a). En effet, les animaux ont été prélevés dans des cliniques vétérinaires et des fermes différentes et par conséquent un mode de vie qui semble être différent. Toutefois, ces résultats soulignent le fait que les animaux peuvent véritablement constituer un réservoir extrahospitalier de la bactérie, et interrogent sur leur implication dans les infections communautaires.

Afin de comprendre si les isolats d'*A.baumannii* d'origine vétérinaire partagent des caractéristiques moléculaires communes avec ceux décrits chez l'homme, Endimiani *et al.* ont analysé 19 souches isolées des animaux de compagnie et des chevaux infectés et hospitalisés. De façon remarquable, ils ont identifié deux clones majoritaires constitués de ST12 et ST15 qui appartiennent aux clones internationaux 2 et 1 respectivement (Endimiani *et al.*, 2011). De même, dans une autre étude, Zordan *et al.* rapportent l'isolement de 56 souches d'*A.baumannii* appartenant aux clones internationaux 1-3 chez 137 animaux hospitalisés dans différents cliniques vétérinaires en Allemagne (Zordan *et al.*, 2011). Cependant, la situation chez les animaux en communauté est différente et des résultats discordants ont été parfois rapportés. Dans une étude réalisée sur l'Ile de la Réunion, et dans le cadre d'une investigation des animaux de compagnies pour la présence d'*A.baumannii*, Belmonte *et al.* ont identifié un même clone (> 90% de similarité en champ pulsé) appartenant au ST25 (un clone international responsable des épidémies chez l'homme) chez 8 animaux parmi les 9 porteurs de la bactérie. Pour expliquer l'homogénéité de ce clone, les auteurs ont suggéré que les animaux pouvaient être contaminés lors d'une hospitalisation préalable ou *via* un autre réservoir comme les animaux errants, les insectes ou les oiseaux (Belmonte *et al.*, 2014). Dans une étude ultérieure conduite par Pailhories *et al.* au sein des mêmes cliniques vétérinaires, 12 souches d'*A.baumannii* plus diversifiées ont été isolées, mais le clone ST25 n'a pas été détecté (Pailhoriès *et al.*, 2015b). Rafei *et al.* ont rapporté une diversité plus importante dans leur étude, où 28 STs dont 21 nouveaux ont été décrits (Rafei *et al.*, 2015a). Dans notre étude, 3 STs ont été identifiés. Le ST20, qui a été isolé d'un prélèvement rectal d'un chat, a été rapporté dans plusieurs cas d'infections chez l'homme (Di Popolo *et al.*, 2011; Jeannot *et al.*, 2014), mais également chez les animaux de compagnie en Suisse (Endimiani *et al.*, 2011). Le ST23, qui a été isolé de la flore buccale d'un autre chat, a aussi été rapporté chez des patients hospitalisés en Norvège (Karah *et al.*, 2011b). Cependant, aucun des STs identifiés chez les animaux dans les deux études réalisées au Liban, n'a été détecté chez des patients (figure 6) (tableau 6).

Récemment, dans le cadre de la surveillance de la résistance chez les animaux en France, Lupo *et al.* ont montré sur 41 souches d'*A.baumannii* isolés des animaux de compagnie dans les régions Ile de France et Rhône-Alpes, l'existence de 7 souches isolées d'infections urinaires appartenant au clone ST25, et partageant plus de 98.8 % de similarité par rep-PCR (DiversiLab) (Lupo *et al.*, 2016). Ces souches produisant l'OXA-23, ont été isolées d'animaux dans la même clinique vétérinaire mais également d'animaux éloignés et non apparentés. Ces résultats supportent ceux d'une étude récente rapportant la présence des souches identiques chez les

animaux de compagnie dans la région de Nantes (Hérivaux *et al.*, 2016), ce qui suggère par conséquent une diffusion d'*A.baumannii* (ST25) portant le gène $bla_{\text{OXA-23}}$ chez les animaux de compagnie et met en évidence une potentielle situation endémique inquiétante (Lupo *et al.*, 2016).

Malgré leur capacité à causer des infections sévères, plusieurs études ont montré que les membres du genre *Acinetobacter* pouvaient coloniser la peau et les voies intestinales (Al Atrouni *et al.*, 2016b; Kempf *et al.*, 2012a; Li *et al.*, 2015a). Cependant, les souches isolées dans un contexte de colonisation sont rarement étudiées au niveau moléculaire. Zeana *et al.* ont comparé 103 souches d'*A.baumannii* issues de 2 hôpitaux à New-York et 23 souches prélevées sur des mains de femme de ménage vivant à proximité des 2 hôpitaux en question. L'analyse des souches par PFGE a montré des clones clairement distincts entre la communauté et l'hôpital (Zeana *et al.*, 2003). D'autres observations ont été rapportées sur l'Ile de la Réunion où une population diversifiée de 8 STs différents a été identifiée chez des souches d'*A.baumannii* isolées dans un contexte de portage rectal (Pailhoriès *et al.*, 2015b). Au Liban, nous avons montré que le taux de portage cutané chez 377 participants était de 3.4%, et aucune souche d'*A.baumannii* n'a été isolée. Ce pourcentage était significativement inférieur à celui rapporté dans la littérature, et aucune conclusion générale ne peut être tirée dans ce périmètre parce que d'une part, les participants ont été investigués une seule fois dans cette étude, et d'autre part, pour des raisons éthiques, nous avons uniquement étudié la colonisation au niveau de deux sites cutanés (orteils, fosse fémorale). Cependant, la présence de 12 souches d'*A.baumannii* isolées lors de dépistage systématique de la colonisation (rectale, nasale, axillaire) dans le service de soins intensifs et qui appartiennent au clone international 2 (ST2) soulève des questions sur l'origine communautaire des souches hospitalière (article1).

Dans ce travail, nous avons également investigué la présence d'*Acinetobacter* dans certains produits destinés à l'alimentation. Ces bactéries ont été détectées sur 30 échantillons de végétaux parmi les 100 analysés. Des études anciennes réalisées à Londres et Hong Kong ont également montré la détection d'*Acinetobacter* sur les végétaux avec des pourcentages de 17 et 50% respectivement (Al Atrouni *et al.*, 2016b). Récemment et de façon alarmante, Carvalheira *et al.* ont rapporté la détection au Portugal d'*Acinetobacter* spp multi-résistants y compris *A.baumannii* sur environ 80% des échantillons de végétaux et de fruits et dans tous les échantillons de viande analysés (Carvalheira *et al.*, 2017a, 2017b). Malgré les différences de prévalences, ces observations montrent que les aliments peuvent représenter un réservoir

potentiel de ces bactéries. D'autre part, des études réalisées aux Etats Unis, au Kenya et en Corée ont rapporté l'isolement d'*Acinetobacter* spp du lait avec des prévalences qui varient entre 0.3% et 7.7% (Gurung *et al.*, 2013; Jayarao and Wang, 1999; Nam *et al.*, 2009; Ndegwa *et al.*, 2001). Au Liban, 5% des échantillons de lait bovin collectés étaient positifs, ce qui était légèrement supérieur au pourcentage détecté par Rafei *et al.* qui ont pu isoler uniquement une souche d'*A.baumannii* dans 37 prélèvements (Rafei *et al.*, 2015a). En outre, nous avons montré que 3 poissons étaient colonisés par *Acinetobacter*, alors que des études précédentes montraient par des approches méta génomique que ces bactéries étaient abondantes dans l'écosystème intestinal des poissons (Etyemez and Balcázar, 2015; Hovda *et al.*, 2007). En se basant sur les données de la littérature ainsi que sur les nôtres, il est clair que ce genre d'aliments peut constituer un réservoir potentiel de ces bactéries opportunistes.

Parmi les souches d'*Acinetobacter* isolées en dehors des hôpitaux, uniquement deux souches d'*A.calcoaceticus* isolées des végétaux consommables et portant le gène $bla_{\text{OXA-72}}$ ont été résistantes aux carbapénèmes. La présence des souches d'*Acinetobacter* spp productrices de carbapénémases a bien été documentée dans l'environnement (Al Atrouni *et al.*, 2016b) et chez les animaux de compagnie et d'élevage (Bayssari *et al.*, 2015; Hérivaux *et al.*, 2016; Pailhoriès *et al.*, 2016b). D'autre part, nous avons montré la présence des souches d'*A.baumannii* productrices de l'OXA-23 et l'OXA-58 en état de portage asymptomatique chez des patients admis dans les hôpitaux libanais. Les résultats obtenus de ces études renforcent les données de la littérature sur l'existence des potentiels réservoirs de résistance aux antibiotiques en milieu communautaires (homme et animaux) et environnemental.

L'analyse des données sur les souches d'*A.baumannii* rapportées dans ce travail et dans la littérature met en évidence un tableau épidémiologique bien particulier. Il est clairement identifié que les infections humaines et les infections des animaux hospitalisés dans les cliniques vétérinaires sont souvent causées par des souches multi-résistantes qui appartiennent aux clones internationaux majeurs (ex :ST2, ST1,ST3), alors que dans l'environnement et en portage communautaire (chez l'homme et chez les animaux), les études ont montré tantôt une diversité des séquences types qui ont été rarement décrits en cas d'infection, ce qui soulève des hypothèses sur l'existence des clones qui peuvent s'adapter uniquement dans une niche écologique particulière, et tantôt la présence des souches qui appartiennent aux clones internationaux (ex :ST25). Cependant pour ces derniers, il manque des informations très importantes telles que la présence d'une hospitalisation et d'une infection préalables des

hommes et des animaux porteurs. Finalement, à partir de ces données empiriques, il est difficile d'élucider les interactions entre ces niches écologiques, même si des ST communs ont été identifiés. Par conséquent, l'existence de lien entre les réservoirs communautaires et hospitaliers reste toujours aujourd'hui soumise à débat.

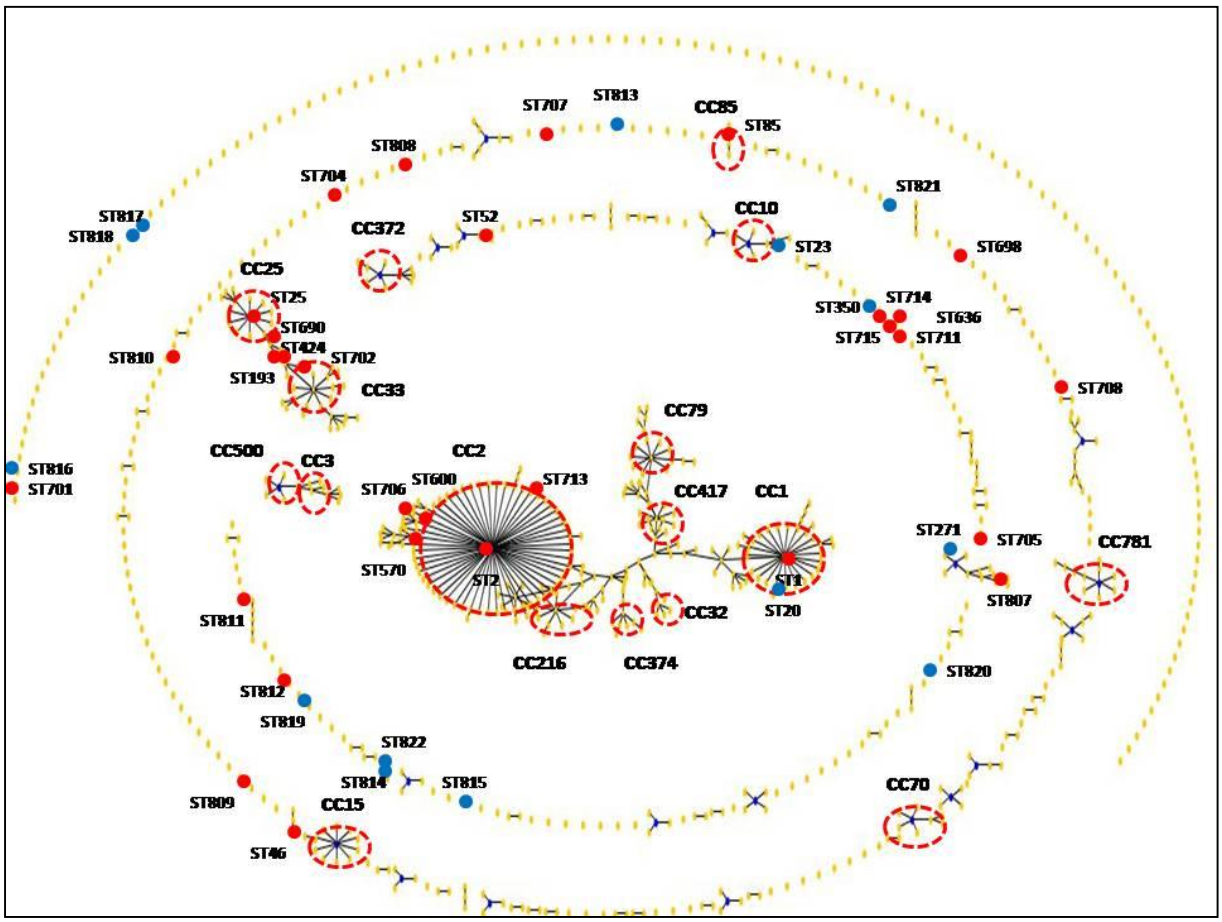


Figure 6: Analyse de la population d'*A.baumannii* par eBurst

Les points rouges et bleus représentent les STs des souches cliniques et extrahospitaliers détectés respectivement dans notre travail

Tableau 6: Recapitulatif des STs décrits chez *A.baumannii* en dehors d'un contexte infectieux

Origine et contexte	Pays	STs	Reference
Environnement (eau)	Liban	1, 46, 108, 294	(Rafei *et al.*, 2015a)
Environnement (eau et sol)	Liban	271, 350, 813-821	Ce travail
Animaux de compagnie et d'élevage (selles/ rectum/ gueule)	Liban	46, 118, 138, 164, 221, 250, 286-294, 464-476	(Rafei *et al.*, 2015a)
Animaux de compagnie (rectum/gueule)	Liban	20, 23, 822	Ce travail
Produits alimentaires (lait, viande, fromage)	Liban	13, 193, 216, 286, 295, 296,	(Rafei *et al.*, 2015a)
Hommes (rectum)	Liban	2, 25, 52, 600	Ce travail
Environnement (Sol/boue)	Ile de la Réunion	1, 583	(Pailhoriès *et al.*, 2015b)
Animaux de compagnie et d'élevage (Pharynx/rectum)	Ile de la Réunion	2, 25, 103, 164, 203, 278, 386, 479-482, 581, 586, 587	(Belmonte *et al.*, 2014; Pailhoriès *et al.*, 2015b)
Hommes (rectum)	Ile de la Réunion	107, 126, 150, 336, 360, 406, 582, 584	(Pailhoriès *et al.*, 2015b)
Animaux de compagnie (Pharynx/rectum)	France	25, 250, 753	(Hérivaux *et al.*, 2016)

Conclusion et perspectives

Nos travaux visaient à analyser l'épidémiologie et l'écologie d'*Acinetobacter* spp au Liban au cours de ces dernières années. En pathologie humaine, nous avons mis en évidence une large dissémination des souches d'*A.baumannii* résistantes aux carbapénèmes, portant le gène $bla_{\text{OXA-23}}$ et appartenant au clone international 2, ce qui a été concordant avec les résultats décrits ailleurs dans le monde. En outre, nos études étaient les premières à rapporter l'émergence des souches non *baumannii* multi-résistantes dans ce pays.

En milieu extrahospitalier, la situation était différente. Nous avons noté la présence de plusieurs réservoirs avec les *Acinetobacter* non *baumannii* les espèces prédominantes. Malgré la faible prévalence, une population non clonale d'*A.baumannii* sensible à la plupart des antibiotiques a été caractérisée. Néanmoins, deux souches d'*A.calcoaceticus* résistantes aux carbapénèmes et productrices d'OXA-72 ont été identifiées sur les végétaux. Le typage par MLST a montré la circulation des séquence types différents de ceux isolés en clinique lors des infections humaines, ce qui suggère l'existence des niches potentiellement environnementales ou animales. D'autre part, nous avons isolé chez les animaux plusieurs souches qui semblent être une nouvelle espèce au sein du genre *Acinetobacter*.

Cependant, ces résultats ne constituent qu'une première avancée vers la connaissance de l'épidémiologie de ces bactéries opportunistes dont les mécanismes de transmission à l'intérieur des hôpitaux restent encore mal connus. Ceci ouvre des nouvelles perspectives pour des prochaines études à plus large échelle :

- Rechercher la présence des nouveaux STs décrits dans l'environnement et chez les animaux dans un contexte d'infection humaine ou animale.
- Explorer les potentielles voies de transmission de la bactérie entre les animaux porteurs, leurs propriétaires, et leur environnement (domicile)
- Déterminer la prévalence de portage digestif d'*A.baumannii* dans la communauté et comparer les souches avec celles qui sont isolées dans un contexte infectieux dans les hôpitaux
- Etablir une étude pour rechercher la présence d'*A.baumannii* dans l'environnement hospitalier (surfaces, matériaux…)

- Rechercher la présence des souches d'*A.baumannii* appartenant aux clones internationaux dans l'environnement et chez les animaux en dehors d'un contexte infectieux pour étudier leurs caractéristiques par génomique comparative (NGS). Ce projet a déjà été mis en place et plusieurs souches appartenant au clone international 1 et 2 ont été sequencées.
- Etudier la pathogénicité et les facteurs de virulence des souches d'*A.baumannii* isolées dans ces différentes études en réalisant des expérimentations *in vitro* et *in silico* par génomique comparative (NGS)
- Rechercher et identifier les autres espèces d'*Acinetobacter* impliquées dans les infections humaines au Liban

Enfin, la question globale de la raison d'une grande diversité des clones retrouvés en milieu extrahospitalier, en parallèle de la sélection de certains clones en milieu hospitalier reste une énigme intéressante pour les années à venir.

Références

Abbas, S., Ahmed, I., Kudo, T., Iida, T., Ali, G.M., Fujiwara, T., and Ohkuma, M. (2014). Heavy metal-tolerant and psychrotolerant bacterium Acinetobacter pakistanensis sp. nov. isolated from a textile dyeing wastewater treatment pond. Pak J Agric Sci *51*, 593–606.

Adams, M.D., Nickel, G.C., Bajaksouzian, S., Lavender, H., Murthy, A.R., Jacobs, M.R., and Bonomo, R.A. (2009). Resistance to colistin in Acinetobacter baumannii associated with mutations in the PmrAB two-component system. Antimicrob. Agents Chemother. *53*, 3628–3634.

Adams-Haduch, J.M., Paterson, D.L., Sidjabat, H.E., Pasculle, A.W., Potoski, B.A., Muto, C.A., Harrison, L.H., and Doi, Y. (2008). Genetic basis of multidrug resistance in Acinetobacter baumannii clinical isolates at a tertiary medical center in Pennsylvania. Antimicrob. Agents Chemother. *52*, 3837–3843.

Afzal-Shah, M., Woodford, N., and Livermore, D.M. (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*, 583–588.

Al-Agamy, M.H., Khalaf, N.G., Tawfick, M.M., Shibl, A.M., and El Kholy, A. (2014). Molecular characterization of carbapenem-insensitive Acinetobacter baumannii in Egypt. Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis. *22*, 49–54.

Ahmed, S.S., and Alp, E. (2015). Genotyping methods for monitoring the epidemic evolution of *A.baumannii* strains. J. Infect. Dev. Ctries. *9*, 347–354.

Ajao, A.O., Robinson, G., Lee, M.S., Ranke, T.D., Venezia, R.A., Furuno, J.P., Harris, A.D., and Johnson, J.K. (2011). Comparison of culture media for detection of Acinetobacter baumannii in surveillance cultures of critically-ill patients. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. *30*, 1425–1430.

Ake, J., Scott, P., Wortmann, G., Huang, X.-Z., Barber, M., Wang, Z., Nikolich, M., Van Echo, D., Weintrob, A., and Lesho, E. (2011). Gram-negative multidrug-resistant organism colonization in a US military healthcare facility in Iraq. Infect. Control Hosp. Epidemiol. *32*, 545–552.

Almasaudi, S.B. (2016). Acinetobacter spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. Saudi J. Biol. Sci.

Alvarez-Buylla, A., Culebras, E., and Picazo, J.J. (2012). Identification of Acinetobacter species: is Bruker biotyper MALDI-TOF mass spectrometry a good alternative to molecular techniques? Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis. *12*, 345–349.

Álvarez-Pérez, S., Lievens, B., Jacquemyn, H., and Herrera, C.M. (2013). Acinetobacter nectaris sp. nov. and Acinetobacter boissieri sp. nov., isolated from floral nectar of wild Mediterranean insect-pollinated plants. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. *63*, 1532–1539.

Anandham, R., Weon, H.-Y., Kim, S.-J., Kim, Y.-S., Kim, B.-Y., and Kwon, S.-W. (2010). Acinetobacter brisouii sp. nov., isolated from a wetland in Korea. J. Microbiol. Seoul Korea *48*, 36–39.

Ansaldi, F., Canepa, P., Bassetti, M., Zancolli, M., Molinari, M.P., Talamini, A., Ginocchio, F., Durando, P., Mussap, M., Orengo, G., *et al.* (2011). Sequential outbreaks of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii in intensive care units of a tertiary referral hospital in Italy: combined molecular approach for epidemiological investigation. J. Hosp. Infect. *79*, 134–140.

Antunes, L.C.S., Imperi, F., Carattoli, A., and Visca, P. (2011). Deciphering the multifactorial nature of Acinetobacter baumannii pathogenicity. PloS One *6*, e22674.

Antunes, L.C.S., Visca, P., and Towner, K.J. (2014). Acinetobacter baumannii: evolution of a global pathogen. Pathog. Dis. *71*, 292–301.

Al Atrouni, A., Joly-Guillou, M.-L., Hamze, M., and Kempf, M. (2016a). Emergence of NDM-1 and OXA-72 producing Acinetobacter pittii clinical isolates in Lebanon. New Microbes New Infect. *12*, 43–44.

Al Atrouni, A., Joly-Guillou, M.-L., Hamze, M., and Kempf, M. (2016b). Reservoirs of Non-baumannii Acinetobacter Species. Front. Microbiol. *7*.

Al Atrouni, A., Hamze, M., Rafei, R., Eveillard, M., Joly-Guillou, M.-L., and Kempf, M. (2016c). Diversity of Acinetobacter species isolated from different environments in Lebanon: a nationwide study. Future Microbiol. *11*, 1147–1156.

Al Atrouni, A., Kempf, M., Eveillard, M., Rafei, R., Hamze, M., and Joly-Guillou, M.-L. (2016d). First report of Oxa-72-producing Acinetobacter calcoaceticus in Lebanon. New Microbes New Infect. *9*, 11–12.

Azimi, L., Talebi, M., Pourshafie, M.-R., Owlia, P., and Rastegar Lari, A. (2015). Characterization of Carbapenemases in Extensively Drug Resistance Acinetobacter baumannii in a Burn Care Center in Iran. Int. J. Mol. Cell. Med. *4*, 46–53.

Bakour, S., Touati, A., Sahli, F., Ameur, A.A., Haouchine, D., and Rolain, J.-M. (2013). Antibiotic resistance determinants of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii clinical isolates in Algeria. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. *76*, 529–531.

Bartual, S.G., Seifert, H., Hippler, C., Luzon, M.A.D., Wisplinghoff, H., and Rodríguez-Valera, F. (2005). Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of Acinetobacter baumannii. J. Clin. Microbiol. *43*, 4382–4390.

Basri, R., Zueter, A.R., Mohamed, Z., Alam, M.K., Norsa'adah, B., Hasan, S.A., Hasan, H., and Ahmad, F. (2015). Burden of bacterial meningitis: a retrospective review on laboratory parameters and factors associated with death in meningitis, kelantan malaysia. Nagoya J. Med. Sci. *77*, 59–68.

Baumann, P., Doudoroff, M., and Stanier, R.Y. (1968). A study of the Moraxella group. II. Oxidative-negative species (genus Acinetobacter). J. Bacteriol. *95*, 1520–1541.

Bayssari, C.A., Dabboussi, F., Hamze, M., and Rolain, J.-M. (2015). Emergence of carbapenemase-producing Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii in livestock animals in Lebanon. J. Antimicrob. Chemother. *70*, 950–951.

De Beaufort, A.J., Bernards, A.T., Dijkshoorn, L., and van Boven, C.P. (1999). Acinetobacter junii causes life-threatening sepsis in preterm infants. Acta Paediatr. Oslo Nor. 1992 *88*, 772–775.

Beceiro, A., Llobet, E., Aranda, J., Bengoechea, J.A., Doumith, M., Hornsey, M., Dhanji, H., Chart, H., Bou, G., Livermore, D.M., *et al.* (2011). Phosphoethanolamine modification of lipid A in colistin-resistant variants of Acinetobacter baumannii mediated by the pmrAB two-component regulatory system. Antimicrob. Agents Chemother. *55*, 3370–3379.

Beijerinck, M.W. (1911). Pigments as products of oxidation by bacterial action. In KNAW, Proceedings, pp. 1910–1911.

Van Belkum, A., Tassios, P.T., Dijkshoorn, L., Haeggman, S., Cookson, B., Fry, N.K., Fussing, V., Green, J., Feil, E., Gerner-Smidt, P., *et al.*, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Study Group on Epidemiological Markers (ESGEM) (2007). Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis. *13 Suppl 3*, 1–46.

Belmonte, O., Pailhoriès, H., Kempf, M., Gaultier, M.P., Lemarié, C., Ramont, C., Joly-Guillou, M.L., and Eveillard, M. (2014). High prevalence of closely-related Acinetobacter baumannii in pets according to a multicentre study in veterinary clinics, Reunion Island. Vet. Microbiol. *170*, 446–450.

Bentancor, L.V., Camacho-Peiro, A., Bozkurt-Guzel, C., Pier, G.B., and Maira-Litrán, T. (2012). Identification of Ata, a multifunctional trimeric autotransporter of Acinetobacter baumannii. J. Bacteriol. *194*, 3950–3960.

Bergogne-Bérézin, E. (2008). Importance of Acinetobacter spp. In Acinetobacter Biology and Pathogenesis, E. Bergogne-Bérézin, H. Friedman, and M. Bendinelli, eds. (Springer US), pp. 1–18.

Berlau, J., Aucken, H.M., Houang, E., and Pitt, T.L. (1999a). Isolation of Acinetobacter spp. including *A.baumannii* from vegetables: implications for hospital-acquired infections. J. Hosp. Infect. *42*, 201–204.

Berlau, J., Aucken, H., Malnick, H., and Pitt, T. (1999b). Distribution of Acinetobacter species on skin of healthy humans. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. *18*, 179–183.

Black, D.M., Rankin, S.C., and King, L.G. (2009). Antimicrobial therapy and aerobic bacteriologic culture patterns in canine intensive care unit patients: 74 dogs (January-June 2006). J. Vet. Emerg. Crit. Care San Antonio Tex 2001 *19*, 489–495.

Boerlin, P., Eugster, S., Gaschen, F., Straub, R., and Schawalder, P. (2001). Transmission of opportunistic pathogens in a veterinary teaching hospital. Vet. Microbiol. *82*, 347–359.

Bogaerts, P., Naas, T., El Garch, F., Cuzon, G., Deplano, A., Delaire, T., Huang, T.-D., Lissoir, B., Nordmann, P., and Glupczynski, Y. (2010). GES extended-spectrum β-lactamases in Acinetobacter baumannii isolates in Belgium. Antimicrob. Agents Chemother. *54*, 4872–4878.

Boll, J.M., Tucker, A.T., Klein, D.R., Beltran, A.M., Brodbelt, J.S., Davies, B.W., and Trent, M.S. (2015). Reinforcing Lipid A Acylation on the Cell Surface of Acinetobacter baumannii Promotes Cationic Antimicrobial Peptide Resistance and Desiccation Survival. mBio *6*, e00478–00415.

Bonnin, R.A., Potron, A., Poirel, L., Lecuyer, H., Neri, R., and Nordmann, P. (2011a). PER-7, an extended-spectrum beta-lactamase with increased activity toward broad-spectrum cephalosporins in Acinetobacter baumannii. Antimicrob. Agents Chemother. *55*, 2424–2427.

Bonnin, R.A., Nordmann, P., Potron, A., Lecuyer, H., Zahar, J.-R., and Poirel, L. (2011b). Carbapenem-hydrolyzing GES-type extended-spectrum beta-lactamase in Acinetobacter baumannii. Antimicrob. Agents Chemother. *55*, 349–354.

Bonnin, R.A., Poirel, L., Naas, T., Pirs, M., Seme, K., Schrenzel, J., and Nordmann, P. (2012). Dissemination of New Delhi metallo-β-lactamase-1-producing Acinetobacter baumannii in Europe. Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis. *18*, E362–365.

Bonnin, R.A., Nordmann, P., and Poirel, L. (2013a). Screening and deciphering antibiotic resistance in Acinetobacter baumannii: a state of the art. Expert Rev. Anti Infect. Ther. *11*, 571–583.

Bonnin, R.A., Cuzon, G., Poirel, L., and Nordmann, P. (2013b). Multidrug-resistant Acinetobacter baumannii clone, France. Emerg. Infect. Dis. *19*, 822–823.

Bonnin, R.A., Poirel, L., and Nordmann, P. (2014a). New Delhi metallo-β-lactamase-producing Acinetobacter baumannii: a novel paradigm for spreading antibiotic resistance genes. Future Microbiol. *9*, 33–41.

Bonnin, R.A., Docobo-Pérez, F., Poirel, L., Villegas, M.-V., and Nordmann, P. (2014b). Emergence of OXA-72-producing Acinetobacter pittii clinical isolates. Int. J. Antimicrob. Agents *43*, 195–196.

Bonnin, R.A., Docobo-Pérez, F., Poirel, L., Villegas, M.-V., and Nordmann, P. (2014c). Emergence of OXA-72-producing Acinetobacter pittii clinical isolates. Int. J. Antimicrob. Agents *43*, 195–196.

Boo, T.W., Walsh, F., and Crowley, B. (2009). Molecular characterization of carbapenem-resistant Acinetobacter species in an Irish university hospital: predominance of Acinetobacter genomic species 3. J. Med. Microbiol. *58*, 209–216.

Bordenave, S., Goñi-Urriza, M.S., Caumette, P., and Duran, R. (2007). Effects of Heavy Fuel Oil on the Bacterial Community Structure of a Pristine Microbial Mat. Appl. Environ. Microbiol. *73*, 6089–6097.

Bošnjak, Z., Plecko, V., Budimir, A., Mareković, I., and Bedenić, B. (2014). First Report of NDM-1-Producing Acinetobacter guillouiae. Chemotherapy *60*, 250–252.

Bou, G., and Martínez-Beltrán, J. (2000). Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC beta-lactamase in Acinetobacter baumannii. Antimicrob. Agents Chemother. *44*, 428–432.

Bou, G., Cerveró, G., Domínguez, M.A., Quereda, C., and Martínez-Beltrán, J. (2000a). PCR-based DNA fingerprinting (REP-PCR, AP-PCR) and pulsed-field gel electrophoresis characterization of a nosocomial outbreak caused by imipenem- and meropenem-resistant Acinetobacter baumannii. Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis. *6*, 635–643.

Bou, G., Oliver, A., and Martínez-Beltrán, J. (2000b). OXA-24, a novel class D beta-lactamase with carbapenemase activity in an Acinetobacter baumannii clinical strain. Antimicrob. Agents Chemother. *44*, 1556–1561.

Bouchet, V., Huot, H., and Goldstein, R. (2008). Molecular genetic basis of ribotyping. Clin. Microbiol. Rev. *21*, 262–273, table of contents.

Bouvet, P.J., and Jeanjean, S. (1989). Delineation of new proteolytic genomic species in the genus Acinetobacter. Res. Microbiol. *140*, 291–299.

Bouvet, P.J.M., and Grimont, P.A.D. (1986). Taxonomy of the Genus Acinetobacter with the Recognition of Acinetobacter baumannii sp. nov., Acinetobacter haemolyticus sp. nov., Acinetobacter johnsonii sp. nov., and Acinetobacter junii sp. nov. and Emended Descriptions of Acinetobacter calcoaceticus and Acinetobacter lwoffii. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. *36*, 228–240.

Bouvresse, S., Socolovshi, C., Berdjane, Z., Durand, R., Izri, A., Raoult, D., Chosidow, O., and Brouqui, P. (2011). No evidence of Bartonella quintana but detection of Acinetobacter baumannii in head lice from elementary schoolchildren in Paris. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. *34*, 475–477.

Brisou, J., and Prevot, A.R. (1954). [Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under Acromobacter group]. Ann. Inst. Pasteur *86*, 722–728.

Van den Broek, P.J., van der Reijden, T.J.K., van Strijen, E., Helmig-Schurter, A.V., Bernards, A.T., and Dijkshoorn, L. (2009). Endemic and epidemic acinetobacter species in a university hospital: an 8-year survey. J. Clin. Microbiol. *47*, 3593–3599.

Byrne-Bailey, K.G., Gaze, W.H., Kay, P., Boxall, A.B.A., Hawkey, P.M., and Wellington, E.M.H. (2009). Prevalence of sulfonamide resistance genes in bacterial isolates from manured agricultural soils and pig slurry in the United Kingdom. Antimicrob. Agents Chemother. *53*, 696–702.

Carr, E.L., Kämpfer, P., Patel, B.K.C., Gürtler, V., and Seviour, R.J. (2003). Seven novel species of Acinetobacter isolated from activated sludge. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. *53*, 953–963.

Carretto, E., Barbarini, D., Farina, C., Grosini, A., Nicoletti, P., and Manso, E., APSI "Acinetobacter Study Group," Italy (2008). Use of the DiversiLab semiautomated repetitive-sequence-based polymerase chain reaction for epidemiologic analysis on Acinetobacter baumannii isolates in different Italian hospitals. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. *60*, 1–7.

Carvalheira, A., Casquete, R., Silva, J., and Teixeira, P. (2017a). Prevalence and antimicrobial susceptibility of Acinetobacter spp. isolated from meat. Int. J. Food Microbiol. *243*, 58–63.

Carvalheira, A., Silva, J., and Teixeira, P. (2017b). Lettuce and fruits as a source of multidrug resistant Acinetobacter spp. Food Microbiol. *64*, 119–125.

Castanheira, M., Costello, S.E., Woosley, L.N., Deshpande, L.M., Davies, T.A., and Jones, R.N. (2014). Evaluation of clonality and carbapenem resistance mechanisms among Acinetobacter baumannii-Acinetobacter calcoaceticus complex and Enterobacteriaceae isolates collected in European and Mediterranean countries and detection of two novel β-lactamases, GES-22 and VIM-35. Antimicrob. Agents Chemother. *58*, 7358–7366.

Castellanos Martínez, E., Telenti Asensio, M., Rodríguez Blanco, V.M., Rodríguez Suárez, M.L., Morena Torrico, A., and Cortina Llosa, A. (1995). Infective endocarditis of an interventricular patch caused by Acinetobacter haemolyticus. Infection *23*, 243–245.

Cayo, R., Merino, M., Ruiz del Castillo, B., Cano, M.E., Calvo, J., Bou, G., and Martinez-Martinez, L. (2014). OXA-207, a Novel OXA-24 Variant with Reduced Catalytic Efficiency against Carbapenems in Acinetobacter pittii from Spain. Antimicrob. Agents Chemother. *58*, 4944–4948.

Cayô, R., Rodríguez, M.-C., Espinal, P., Fernández-Cuenca, F., Ocampo-Sosa, A.A., Pascual, A., Ayala, J.A., Vila, J., and Martínez-Martínez, L. (2011). Analysis of genes encoding penicillin-binding proteins in clinical isolates of Acinetobacter baumannii. Antimicrob. Agents Chemother. *55*, 5907–5913.

Celenza, G., Pellegrini, C., Caccamo, M., Segatore, B., Amicosante, G., and Perilli, M. (2006). Spread of bla(CTX-M-type) and bla(PER-2) beta-lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals. J. Antimicrob. Chemother. *57*, 975–978.

Di Cello, F., Pepi, M., Baldi, F., and Fani, R. (1997). Molecular characterization of an n-alkane-degrading bacterial community and identification of a new species, Acinetobacter venetianus. Res. Microbiol. *148*, 237–249.

Cetin, E.S., Durmaz, R., Tetik, T., Otlu, B., Kaya, S., and Calişkan, A. (2009). Epidemiologic characterization of nosocomial Acinetobacter baumannii infections in a Turkish university hospital by pulsed-field gel electrophoresis. Am. J. Infect. Control *37*, 56–64.

Chamoun, K., Farah, M., Araj, G., Daoud, Z., Moghnieh, R., Salameh, P., Saade, D., Mokhbat, J., Abboud, E., Hamze, M., *et al.* (2016). Surveillance of antimicrobial resistance in Lebanese hospitals: retrospective nationwide compiled data. Int. J. Infect. Dis. *46*, 64–70.

Chan, J.Z.-M., Halachev, M.R., Loman, N.J., Constantinidou, C., and Pallen, M.J. (2012). Defining bacterial species in the genomic era: insights from the genus Acinetobacter. BMC Microbiol. *12*, 302.

Chang, H.C., Wei, Y.F., Dijkshoorn, L., Vaneechoutte, M., Tang, C.T., and Chang, T.C. (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*, 1632–1639.

Chaudhary, H.J., Peng, G., Hu, M., He, Y., Yang, L., Luo, Y., and Tan, Z. (2012). Genetic diversity of endophytic diazotrophs of the wild rice, Oryza alta and identification of the new diazotroph, Acinetobacter oryzae sp. nov. Microb. Ecol. *63*, 813–821.

Chen, Q., Li, X., Zhou, H., Jiang, Y., Chen, Y., Hua, X., and Yu, Y. (2014). Decreased susceptibility to tigecycline in Acinetobacter baumannii mediated by a mutation in trm encoding SAM-dependent methyltransferase. J. Antimicrob. Chemother. *69*, 72–76.

Chen, T.-L., Siu, L.-K., Wu, R.C.-C., Shaio, M.-F., Huang, L.-Y., Fung, C.-P., Lee, C.-M., and Cho, W.-L. (2007). Comparison of one-tube multiplex PCR, automated ribotyping and intergenic spacer (ITS) sequencing for rapid identification of Acinetobacter baumannii. Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis. *13*, 801–806.

Chen, T.-L., Chang, W.-C., Kuo, S.-C., Lee, Y.-T., Chen, C.-P., Siu, L.-K., Cho, W.-L., and Fung, C.-P. (2010). Contribution of a Plasmid-Borne blaOXA-58 Gene with Its Hybrid Promoter Provided by IS1006 and an ISAba3-Like Element to β-Lactam Resistance in Acinetobacter Genomic Species 13TU. Antimicrob. Agents Chemother. *54*, 3107–3112.

Chen, Y., Zhou, Z., Jiang, Y., and Yu, Y. (2011). Emergence of NDM-1-producing Acinetobacter baumannii in China. J. Antimicrob. Chemother. *66*, 1255–1259.

Chen, Y., Cui, Y., Pu, F., Jiang, G., Zhao, X., Yuan, Y., Zhao, W., Li, D., Liu, H., Li, Y., *et al.* (2012). Draft Genome Sequence of an Acinetobacter Genomic Species 3 Strain Harboring a blaNDM-1 Gene. J. Bacteriol. *194*, 204–205.

Chiang, M.-C., Kuo, S.-C., Chen, Y.-C., Lee, Y.-T., Chen, T.-L., and Fung, C.-P. (2011). Polymerase chain reaction assay for the detection of Acinetobacter baumannii in endotracheal aspirates from patients in the intensive care unit. J. Microbiol. Immunol. Infect. Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi *44*, 106–110.

Chim, H., Tan, B.H., and Song, C. (2007). Five-year review of infections in a burn intensive care unit: High incidence of Acinetobacter baumannii in a tropical climate. Burns J. Int. Soc. Burn Inj. *33*, 1008–1014.

Choi, A.H.K., Slamti, L., Avci, F.Y., Pier, G.B., and Maira-Litrán, T. (2009). The pgaABCD locus of Acinetobacter baumannii encodes the production of poly-beta-1-6-N-acetylglucosamine, which is critical for biofilm formation. J. Bacteriol. *191*, 5953–5963.

Choi, C.H., Lee, E.Y., Lee, Y.C., Park, T.I., Kim, H.J., Hyun, S.H., Kim, S.A., Lee, S.-K., and Lee, J.C. (2005). Outer membrane protein 38 of Acinetobacter baumannii localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. Cell. Microbiol. *7*, 1127–1138.

Choi, C.H., Lee, J.S., Lee, Y.C., Park, T.I., and Lee, J.C. (2008). Acinetobacter baumannii invades epithelial cells and outer membrane protein A mediates interactions with epithelial cells. BMC Microbiol. *8*, 216.

Choi, J.Y., Ko, G., Jheong, W., Huys, G., Seifert, H., Dijkshoorn, L., and Ko, K.S. (2013). Acinetobacter kookii sp. nov., isolated from soil. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. *63*, 4402–4406.

Choi, J.-Y., Kim, Y., Ko, E.A., Park, Y.K., Jheong, W.-H., Ko, G., and Ko, K.S. (2012). Acinetobacter species isolates from a range of environments: species survey and observations of antimicrobial resistance. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. *74*, 177–180.

Chu, Y.W., Leung, C.M., Houang, E.T., Ng, K.C., Leung, C.B., Leung, H.Y., and Cheng, A.F. (1999). Skin carriage of acinetobacters in Hong Kong. J. Clin. Microbiol. *37*, 2962–2967.

Chu, Y.-W., Afzal-Shah, M., Houang, E.T.S., Palepou, M.-F.I., Lyon, D.J., Woodford, N., and Livermore, D.M. (2001). IMP-4, a Novel Metallo-β-Lactamase from Nosocomial Acinetobacter spp. Collected in Hong Kong between 1994 and 1998. Antimicrob. Agents Chemother. *45*, 710–714.

Chusri, S., Chongsuvivatwong, V., Rivera, J.I., Silpapojakul, K., Singkhamanan, K., McNeil, E., and Doi, Y. (2014). Clinical outcomes of hospital-acquired infection with Acinetobacter nosocomialis and Acinetobacter pittii. Antimicrob. Agents Chemother. *58*, 4172–4179.

Cirioni, O., Simonetti, O., Pierpaoli, E., Barucca, A., Ghiselli, R., Orlando, F., Pelloni, M., Trombettoni, M.M.C., Guerrieri, M., Offidani, A., *et al.* (2016). Colistin enhances therapeutic efficacy of daptomycin or teicoplanin in a murine model of multiresistant Acinetobacter baumannii sepsis. Diagn. Microbiol. Infect. Dis.

Cisneros, J.M., and Rodríguez-Baño, J. (2002). Nosocomial bacteremia due to Acinetobacter baumannii: epidemiology, clinical features and treatment. Clin. Microbiol. Infect. *8*, 687–693.

Cosgaya, C., Marí-Almirall, M., Van Assche, A., Fernández-Orth, D., Mosqueda, N., Telli, M., Huys, G., Higgins, P.G., Seifert, H., Lievens, B., *et al.* (2016). Acinetobacter dijkshoorniae sp. nov., a new member of the Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii complex mainly recovered from clinical samples in different countries. Int. J. Syst. Evol. Microbiol.

Coyne, S., Courvalin, P., and Périchon, B. (2011). Efflux-mediated antibiotic resistance in Acinetobacter spp. Antimicrob. Agents Chemother. *55*, 947–953.

Cray, J.A., Bell, A.N.W., Bhaganna, P., Mswaka, A.Y., Timson, D.J., and Hallsworth, J.E. (2013). The biology of habitat dominance; can microbes behave as weeds? Microb. Biotechnol. *6*, 453–492.

Dahal, R.H., Chaudhary, D.K., and Kim, J. (2017). Acinetobacter halotolerans sp. nov., a novel halotolerant, alkalitolerant, and hydrocarbon degrading bacterium, isolated from soil. Arch. Microbiol.

Dahdouh, E., Hajjar, M., Suarez, M., and Daoud, Z. (2016). Acinetobacter baumannii Isolated from Lebanese Patients: Phenotypes and Genotypes of Resistance, Clonality, and Determinants of Pathogenicity. Front. Cell. Infect. Microbiol. *6*, 163.

Damier-Piolle, L., Magnet, S., Brémont, S., Lambert, T., and Courvalin, P. (2008). AdeIJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in Acinetobacter baumannii. Antimicrob. Agents Chemother. *52*, 557–562.

Decker, B.K., Perez, F., Hujer, A.M., Hujer, K.M., Hall, G.S., Jacobs, M.R., Gebreyes, W.A., Zoll, S.T., Massire, C., Eshoo, M.W., *et al.* (2012). Longitudinal analysis of the temporal evolution of Acinetobacter baumannii strains in Ohio, USA, by using rapid automated typing methods. PloS One *7*, e33443.

Decousser, J.W., Jansen, C., Nordmann, P., Emirian, A., Bonnin, R.A., Anais, L., Merle, J.C., and Poirel, L. (2013). Outbreak of NDM-1-producing Acinetobacter baumannii in France, January to May 2013. Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull. *18*.

Van Dessel, H., Kamp-Hopmans, T.E.M., Fluit, A.C., Brisse, S., de Smet, A.M.G.A., Dijkshoorn, L., Troelstra, A., Verhoef, J., and Mascini, E.M. (2002). Outbreak of a susceptible strain of Acinetobacter species 13 (sensu Tjernberg and Ursing) in an adult neurosurgical intensive care unit. J. Hosp. Infect. *51*, 89–95.

Van Dessel, H., Dijkshoorn, L., van der Reijden, T., Bakker, N., Paauw, A., van den Broek, P., Verhoef, J., and Brisse, S. (2004). Identification of a new geographically widespread multiresistant Acinetobacter baumannii clone from European hospitals. Res. Microbiol. *155*, 105–112.

Diancourt, L., Passet, V., Nemec, A., Dijkshoorn, L., and Brisse, S. (2010). The population structure of Acinetobacter baumannii: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. PloS One *5*, e10034.

Dijkshoorn, L., and Nemec, A. (2008). The diversity of the genus Acinetobacter. Acinetobacter Mol. Microbiol. 1–34.

Dijkshoorn, L., van Aken, E., Shunburne, L., van der Reijden, T.J.K., Bernards, A.T., Nemec, A., and Towner, K.J. (2005). Prevalence of Acinetobacter baumannii and other Acinetobacter spp. in faecal samples from non-hospitalised individuals. Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis. *11*, 329–332.

Dijkshoorn, L., Nemec, A., and Seifert, H. (2007). An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant Acinetobacter baumannii. Nat. Rev. Microbiol. *5*, 939–951.

Doi, Y., and Arakawa, Y. (2007). 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. *45*, 88–94.

Donnarumma, F., Sergi, S., Indorato, C., Mastromei, G., Monnanni, R., Nicoletti, P., Pecile, P., Cecconi, D., Mannino, R., Bencini, S., *et al.* (2010). Molecular characterization of acinetobacter isolates collected in intensive care units of six hospitals in Florence, Italy, during a 3-year surveillance program: a population structure analysis. J. Clin. Microbiol. *48*, 1297–1304.

Doughari, H.J., Ndakidemi, P.A., Human, I.S., and Benade, S. (2011). The Ecology, Biology and Pathogenesis of Acinetobacter spp.: An Overview. Microbes Environ. *26*, 101–112.

Du, J., Singh, H., Yu, H., Jin, F.-X., and Yi, T.-H. (2016). Acinetobacter plantarum sp. nov. isolated from wheat seedlings plant. Arch. Microbiol. *198*, 393–398.

Ecker, J.A., Massire, C., Hall, T.A., Ranken, R., Pennella, T.-T.D., Agasino Ivy, C., Blyn, L.B., Hofstadler, S.A., Endy, T.P., Scott, P.T., *et al.* (2006). Identification of Acinetobacter species and genotyping of Acinetobacter baumannii by multilocus PCR and mass spectrometry. J. Clin. Microbiol. *44*, 2921–2932.

Eckmann, C., Montravers, P., Bassetti, M., Bodmann, K.F., Heizmann, W.R., Sánchez García, M., Guirao, X., Capparella, M.R., Simoneau, D., and Dupont, H. (2013). Efficacy of tigecycline for the treatment of complicated

intra-abdominal infections in real-life clinical practice from five European observational studies. J. Antimicrob. Chemother. *68 Suppl 2*, ii25–35.

Ellis, T.N., and Kuehn, M.J. (2010). Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR *74*, 81–94.

El-Shazly, S., Dashti, A., Vali, L., Bolaris, M., and Ibrahim, A.S. (2015). Molecular epidemiology and characterization of multiple drug-resistant (MDR) clinical isolates of Acinetobacter baumannii. Int. J. Infect. Dis. *41*, 42–49.

Endimiani, A., Luzzaro, F., Migliavacca, R., Mantengoli, E., Hujer, A.M., Hujer, K.M., Pagani, L., Bonomo, R.A., Rossolini, G.M., and Toniolo, A. (2007). Spread in an Italian hospital of a clonal Acinetobacter baumannii strain producing the TEM-92 extended-spectrum beta-lactamase. Antimicrob. Agents Chemother. *51*, 2211–2214.

Endimiani, A., Hujer, K.M., Hujer, A.M., Bertschy, I., Rossano, A., Koch, C., Gerber, V., Francey, T., Bonomo, R.A., and Perreten, V. (2011). Acinetobacter baumannii isolates from pets and horses in Switzerland: molecular characterization and clinical data. J. Antimicrob. Chemother. *66*, 2248–2254.

Endo, S., Yano, H., Kanamori, H., Inomata, S., Aoyagi, T., Hatta, M., Gu, Y., Tokuda, K., Kitagawa, M., and Kaku, M. (2014). High Frequency of Acinetobacter soli among Acinetobacter Isolates Causing Bacteremia at a Tertiary Hospital in Japan. J. Clin. Microbiol. *52*, 911–915.

Espinal, P., Roca, I., and Vila, J. (2011). Clinical impact and molecular basis of antimicrobial resistance in non-baumannii Acinetobacter. Future Microbiol. *6*, 495–511.

Espinal, P., Seifert, H., Dijkshoorn, L., Vila, J., and Roca, I. (2012). Rapid and accurate identification of genomic species from the Acinetobacter baumannii (Ab) group by MALDI-TOF MS. Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis. *18*, 1097–1103.

Etyemez, M., and Balcázar, J.L. (2015). Bacterial community structure in the intestinal ecosystem of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) as revealed by pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes. Res. Vet. Sci. *100*, 8–11.

Evans, B.A., and Amyes, S.G.B. (2014). OXA β-lactamases. Clin. Microbiol. Rev. *27*, 241–263.

Eveillard, M., and Joly-Guillou, M.-L. (2012). [Emerging Acinetobacter baumannii infections and factors favouring their occurrence]. Pathol. Biol. (Paris) *60*, 314–319.

Eveillard, M., Kempf, M., Belmonte, O., Pailhoriès, H., and Joly-Guillou, M.-L. (2013). Reservoirs of Acinetobacter baumannii outside the hospital and potential involvement in emerging human community-acquired infections. Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis. *17*, e802–805.

Falagas, M.E., and Rafailidis, P.I. (2007). Attributable mortality of Acinetobacter baumannii: no longer a controversial issue. Crit. Care Lond. Engl. *11*, 134.

Falagas, M.E., Vardakas, K.Z., Kapaskelis, A., Triarides, N.A., and Roussos, N.S. (2015). Tetracyclines for multidrug-resistant Acinetobacter baumannii infections. Int. J. Antimicrob. Agents *45*, 455–460.

Feng, G., Yang, S., Wang, Y., Yao, Q., and Zhu, H. (2014a). Acinetobacter refrigeratoris [corrected] sp. nov., isolated from a domestic refrigerator. Curr. Microbiol. *69*, 888–893.

Feng, G.-D., Yang, S.-Z., Wang, Y.-H., Deng, M.-R., and Zhu, H.-H. (2014b). Acinetobacter guangdongensis sp. nov., isolated from abandoned lead-zinc ore. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. *64*, 3417–3421.

Fiester, S.E., and Actis, L.A. (2013). Stress responses in the opportunistic pathogen Acinetobacter baumannii. Future Microbiol. *8*, 353–365.

Fitzpatrick, M.A., Ozer, E., Bolon, M.K., and Hauser, A.R. (2015). Influence of Acb complex genospecies on clinical outcomes in a U.S. hospital with high rates of multidrug resistance. J. Infect. *70*, 144–152.

Fitzpatrick, M.A., Ozer, E.A., and Hauser, A.R. (2016). Utility of Whole-Genome Sequencing in Characterizing Acinetobacter Epidemiology and Analyzing Hospital Outbreaks. J. Clin. Microbiol. *54*, 593–612.

Fouad, M., Attia, A.S., Tawakkol, W.M., and Hashem, A.M. (2013). Emergence of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii harboring the OXA-23 carbapenemase in intensive care units of Egyptian hospitals. Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis. *17*, e1252–1254.

Fu, Y., Zhou, J., Zhou, H., Yang, Q., Wei, Z., Yu, Y., and Li, L. (2010). Wide dissemination of OXA-23-producing carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii clonal complex 22 in multiple cities of China. J. Antimicrob. Chemother. *65*, 644–650.

Fu, Y., Du, X., Ji, J., Chen, Y., Jiang, Y., and Yu, Y. (2012). Epidemiological characteristics and genetic structure of blaNDM-1 in non-baumannii Acinetobacter spp. in China. J. Antimicrob. Chemother. *67*, 2114–2122.

Fu, Y., Jiang, J., Zhou, H., Jiang, Y., Fu, Y., Yu, Y., and Zhou, J. (2014). Characterization of a Novel Plasmid Type and Various Genetic Contexts of blaOXA-58 in Acinetobacter spp. from Multiple Cities in China. PLoS ONE *9*, e84680.

Fu, Y., Liu, L., Li, X., Chen, Y., Jiang, Y., Wang, Y., Yu, Y., and Xie, X. (2015). Spread of a common blaNDM-1-carrying plasmid among diverse Acinetobacter species. Infect. Genet. Evol. *32*, 30–33.

Gaddy, J.A., and Actis, L.A. (2009). Regulation of Acinetobacter baumannii biofilm formation. Future Microbiol. *4*, 273–278.

Gaddy, J.A., Tomaras, A.P., and Actis, L.A. (2009). The Acinetobacter baumannii 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells. Infect. Immun. *77*, 3150–3160.

Gaddy, J.A., Arivett, B.A., McConnell, M.J., López-Rojas, R., Pachón, J., and Actis, L.A. (2012). Role of acinetobactin-mediated iron acquisition functions in the interaction of Acinetobacter baumannii strain ATCC 19606T with human lung epithelial cells, Galleria mellonella caterpillars, and mice. Infect. Immun. *80*, 1015–1024.

Gales, A.C., Tognim, M.C.B., Reis, A.O., Jones, R.N., and Sader, H.S. (2003). Emergence of an IMP-like metallo-enzyme in an Acinetobacter baumannii clinical strain from a Brazilian teaching hospital. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. *45*, 77–79.

Ganjo, A.R., Maghdid, D.M., Mansoor, I.Y., Kok, D.J., Severin, J.A., Verbrugh, H.A., Kreft, D., Fatah, M.H., Alnakshabandi, A.A., Dlnya, A., *et al.* (2016). OXA-Carbapenemases Present in Clinical Acinetobacter baumannii-calcoaceticus Complex Isolates from Patients in Kurdistan, Region, Iraq. Microb. Drug Resist. Larchmt. N.

Garnacho-Montero, J., Amaya-Villar, R., Ferrándiz-Millón, C., Díaz-Martín, A., López-Sánchez, J.M., and Gutiérrez-Pizarraya, A. (2015). Optimum treatment strategies for carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii bacteremia. Expert Rev. Anti Infect. Ther. *13*, 769–777.

Geisinger, E., and Isberg, R.R. (2015). Antibiotic modulation of capsular exopolysaccharide and virulence in Acinetobacter baumannii. PLoS Pathog. *11*, e1004691.

Gerner-Smidt, P. (1992). Ribotyping of the Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii complex. J. Clin. Microbiol. *30*, 2680–2685.

Gerner-Smidt, P., and Tjernberg, I. (1993). Acinetobacter in Denmark: II. Molecular studies of the Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii complex. APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. *101*, 826–832.

Getchell-White, S.I., Donowitz, L.G., and Gröschel, D.H. (1989). The inanimate environment of an intensive care unit as a potential source of nosocomial bacteria: evidence for long survival of Acinetobacter calcoaceticus. Infect. Control Hosp. Epidemiol. *10*, 402–407.

Ghazawi, A., Sonnevend, A., Bonnin, R.A., Poirel, L., Nordmann, P., Hashmey, R., Rizvi, T.A., B Hamadeh, M., and Pál, T. (2012). NDM-2 carbapenemase-producing Acinetobacter baumannii in the United Arab Emirates. Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis. *18*, E34–36.

Girlich, D., Damaceno, Q.S., Oliveira, A.C., and Nordmann, P. (2014). OXA-253, a variant of the carbapenem-hydrolyzing class D β-lactamase OXA-143 in Acinetobacter baumannii. Antimicrob. Agents Chemother. *58*, 2976–2978.

Gogou, V., Pournaras, S., Giannouli, M., Voulgari, E., Piperaki, E.-T., Zarrilli, R., and Tsakris, A. (2011). Evolution of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii clonal lineages: a 10 year study in Greece (2000-09). J. Antimicrob. Chemother. *66*, 2767–2772.

Gouveia, C., Asensi, M.D., Zahner, V., Rangel, E.F., and Oliveira, S.M.P. de (2008). Study on the bacterial midgut microbiota associated to different Brazilian populations of Lutzomyia longipalpis (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae). Neotrop. Entomol. *37*, 597–601.

Grosso, F., Quinteira, S., and Peixe, L. (2011). Understanding the dynamics of imipenem-resistant Acinetobacter baumannii lineages within Portugal. Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis. *17*, 1275–1279.

Grotiuz, G., Sirok, A., Gadea, P., Varela, G., and Schelotto, F. (2006). Shiga toxin 2-producing Acinetobacter haemolyticus associated with a case of bloody diarrhea. J. Clin. Microbiol. *44*, 3838–3841.

Gundi, V.A.K.B., Dijkshoorn, L., Burignat, S., Raoult, D., and La Scola, B. (2009). Validation of partial rpoB gene sequence analysis for the identification of clinically important and emerging Acinetobacter species. Microbiology *155*, 2333–2341.

Gurung, M., Nam, H.M., Tamang, M.D., Chae, M.H., Jang, G.C., Jung, S.C., and Lim, S.K. (2013). Prevalence and antimicrobial susceptibility of Acinetobacter from raw bulk tank milk in Korea. J. Dairy Sci. *96*, 1997–2002.

Hammami, S., Dahdeh, C., Mamlouk, K., Ferjeni, S., Maamar, E., Hamzaoui, Z., Saidani, M., Ghedira, S., Houissa, M., Slim, A., *et al.* (2017). Rectal Carriage of Extended-Spectrum Beta-Lactamase and Carbapenemase Producing Gram-Negative Bacilli in Intensive Care Units in Tunisia. Microb. Drug Resist. Larchmt. N.

Hammoudi, D., Moubareck, C.A., Hakime, N., Houmani, M., Barakat, A., Najjar, Z., Suleiman, M., Fayad, N., Sarraf, R., and Sarkis, D.K. (2015). Spread of imipenem-resistant Acinetobacter baumannii co-expressing OXA-23 and GES-11 carbapenemases in Lebanon. Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis. *36*, 56–61.

Hamouda, A., Evans, B.A., Towner, K.J., and Amyes, S.G.B. (2010). Characterization of epidemiologically unrelated Acinetobacter baumannii isolates from four continents by use of multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and sequence-based typing of bla(OXA-51-like) genes. J. Clin. Microbiol. *48*, 2476–2483.

Hamouda, A., Findlay, J., Al Hassan, L., and Amyes, S.G.B. (2011). Epidemiology of Acinetobacter baumannii of animal origin. Int. J. Antimicrob. Agents *38*, 314–318.

Hamzeh, A.R., Al Najjar, M., and Mahfoud, M. (2012). Prevalence of antibiotic resistance among Acinetobacter baumannii isolates from Aleppo, Syria. Am. J. Infect. Control *40*, 776–777.

Al-Hassan, L., El Mahallawy, H., and Amyes, S.G.B. (2013). First report of bla(PER-3) in Acinetobacter baumannii. Int. J. Antimicrob. Agents *41*, 93–94.

Hawkey, P., and Bergogne-Berezin, E. (2006). Acinetobacter spp. In Principles and Practice of Clinical Bacteriology, S.H. Gillespie, and P.M. Hawkey, eds. (John Wiley & Sons, Ltd), pp. 231–244.

Héritier, C., Poirel, L., Aubert, D., and Nordmann, P. (2003). Genetic and functional analysis of the chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-40 of Acinetobacter baumannii. Antimicrob. Agents Chemother. *47*, 268–273.

Héritier, C., Poirel, L., Fournier, P.-E., Claverie, J.-M., Raoult, D., and Nordmann, P. (2005). Characterization of the naturally occurring oxacillinase of Acinetobacter baumannii. Antimicrob. Agents Chemother. *49*, 4174–4179.

Héritier, C., Poirel, L., and Nordmann, P. (2006). Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of ISAba1 in Acinetobacter baumannii. Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis. *12*, 123–130.

Hérivaux, A., Pailhoriès, H., Quinqueneau, C., Lemarié, C., Joly-Guillou, M.-L., Ruvoen, N., Eveillard, M., and Kempf, M. (2016). First report of carbapenemase-producing Acinetobacter baumannii carriage in pets from the community in France. Int. J. Antimicrob. Agents *48*, 220–221.

Heydari, F., Mammina, C., and Koksal, F. (2015). NDM-1-producing Acinetobacter baumannii ST85 now in Turkey, including one isolate from a Syrian refugee. J. Med. Microbiol. *64*, 1027–1029.

Higgins, P.G., Wisplinghoff, H., Krut, O., and Seifert, H. (2007). A PCR-based method to differentiate between Acinetobacter baumannii and Acinetobacter genomic species 13TU. Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis. *13*, 1199–1201.

Higgins, P.G., Poirel, L., Lehmann, M., Nordmann, P., and Seifert, H. (2009). OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase in Acinetobacter baumannii. Antimicrob. Agents Chemother. *53*, 5035–5038.

Higgins, P.G., Lehmann, M., Wisplinghoff, H., and Seifert, H. (2010a). gyrB multiplex PCR to differentiate between Acinetobacter calcoaceticus and Acinetobacter genomic species 3. J. Clin. Microbiol. *48*, 4592–4594.

Higgins, P.G., Dammhayn, C., Hackel, M., and Seifert, H. (2010b). Global spread of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii. J. Antimicrob. Chemother. *65*, 233–238.

Higgins, P.G., Janssen, K., Fresen, M.M., Wisplinghoff, H., and Seifert, H. (2012). Molecular epidemiology of Acinetobacter baumannii bloodstream isolates obtained in the United States from 1995 to 2004 using rep-PCR and multilocus sequence typing. J. Clin. Microbiol. *50*, 3493–3500.

Higgins, P.G., Pérez-Llarena, F.J., Zander, E., Fernández, A., Bou, G., and Seifert, H. (2013). OXA-235, a novel class D β-lactamase involved in resistance to carbapenems in Acinetobacter baumannii. Antimicrob. Agents Chemother. *57*, 2121–2126.

Hindler, J.A., and Humphries, R.M. (2013). Colistin MIC variability by method for contemporary clinical isolates of multidrug-resistant Gram-negative bacilli. J. Clin. Microbiol. *51*, 1678–1684.

Hojabri, Z., Pajand, O., Bonura, C., Aleo, A., Giammanco, A., and Mammina, C. (2014). Molecular epidemiology of Acinetobacter baumannii in Iran: endemic and epidemic spread of multiresistant isolates. J. Antimicrob. Chemother. *69*, 2383–2387.

Horii, T., Tamai, K., Mitsui, M., Notake, S., and Yanagisawa, H. (2011). Blood stream infections caused by Acinetobacter ursingii in an obstetrics ward. Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis. *11*, 52–56.

Horrevorts, A., Bergman, K., Kollée, L., Breuker, I., Tjernberg, I., and Dijkshoorn, L. (1995). Clinical and epidemiological investigations of Acinetobacter genomospecies 3 in a neonatal intensive care unit. J. Clin. Microbiol. *33*, 1567–1572.

Houang, E.T., Chu, Y.W., Leung, C.M., Chu, K.Y., Berlau, J., Ng, K.C., and Cheng, A.F. (2001). Epidemiology and infection control implications of Acinetobacter spp. in Hong Kong. J. Clin. Microbiol. *39*, 228–234.

Hovda, M.B., Lunestad, B.T., Fontanillas, R., and Rosnes, J.T. (2007). Molecular characterisation of the intestinal microbiota of farmed Atlantic salmon (Salmo salar L.). Aquaculture *272*, 581–588.

Howard, A., O'Donoghue, M., Feeney, A., and Sleator, R.D. (2012). Acinetobacter baumannii: an emerging opportunistic pathogen. Virulence *3*, 243–250.

Hu, H., Hu, Y., Pan, Y., Liang, H., Wang, H., Wang, X., Hao, Q., Yang, X., Yang, X., Xiao, X., *et al.* (2012). Novel Plasmid and Its Variant Harboring both a blaNDM-1 Gene and Type IV Secretion System in Clinical Isolates of Acinetobacter lwoffii. Antimicrob. Agents Chemother. *56*, 1698–1702.

Hu, Y., Li, B., Jin, D., Cui, Z., Tao, X., Zhang, B., and Zhang, J. (2013). Comparison of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis with pulsed-field gel electrophoresis typing of Acinetobacter baumannii in China. J. Clin. Microbiol. *51*, 1263–1268.

Hu, Y., Feng, Y., Zhang, X., and Zong, Z. (2017). Acinetobacter defluvii sp. nov., recovered from hospital sewage. Int. J. Syst. Evol. Microbiol.

Huang, L.-Y., Chen, T.-L., Lu, P.-L., Tsai, C.-A., Cho, W.-L., Chang, F.-Y., Fung, C.-P., and Siu, L.K. (2008). Dissemination of multidrug-resistant, class 1 integron-carrying Acinetobacter baumannii isolates in Taiwan. Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis. *14*, 1010–1019.

Hujer, K.M., Hamza, N.S., Hujer, A.M., Perez, F., Helfand, M.S., Bethel, C.R., Thomson, J.M., Anderson, V.E., Barlow, M., Rice, L.B., *et al.* (2005). Identification of a new allelic variant of the Acinetobacter baumannii cephalosporinase, ADC-7 beta-lactamase: defining a unique family of class C enzymes. Antimicrob. Agents Chemother. *49*, 2941–2948.

Huys, G., Cnockaert, M., Nemec, A., and Swings, J. (2005). Sequence-based typing of ade B as a potential tool to identify intraspecific groups among clinical strains of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii. J. Clin. Microbiol. *43*, 5327–5331.

Huys, G., Bartie, K., Cnockaert, M., Hoang Oanh, D.T., Phuong, N.T., Somsiri, T., Chinabut, S., Yusoff, F.M., Shariff, M., Giacomini, M., *et al.* (2007). Biodiversity of chloramphenicol-resistant mesophilic heterotrophs from Southeast Asian aquaculture environments. Res. Microbiol. *158*, 228–235.

Idzenga, D., Schouten, M.A., and van Zanten, A.R.H. (2006). Outbreak of Acinetobacter genomic species 3 in a Dutch intensive care unit. J. Hosp. Infect. *63*, 485–487.

Iwashkiw, J.A., Seper, A., Weber, B.S., Scott, N.E., Vinogradov, E., Stratilo, C., Reiz, B., Cordwell, S.J., Whittal, R., Schild, S., *et al.* (2012). Identification of a general O-linked protein glycosylation system in Acinetobacter baumannii and its role in virulence and biofilm formation. PLoS Pathog. *8*, e1002758.

Jacobs, A.C., Hood, I., Boyd, K.L., Olson, P.D., Morrison, J.M., Carson, S., Sayood, K., Iwen, P.C., Skaar, E.P., and Dunman, P.M. (2010). Inactivation of phospholipase D diminishes Acinetobacter baumannii pathogenesis. Infect. Immun. *78*, 1952–1962.

Janda, J.M., and Abbott, S.L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. J. Clin. Microbiol. *45*, 2761–2764.

Jawad, A., Hawkey, P.M., Heritage, J., and Snelling, A.M. (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*, 2353–2358.

Jayarao, B.M., and Wang, L. (1999). A study on the prevalence of gram-negative bacteria in bulk tank milk. J. Dairy Sci. *82*, 2620–2624.

Jeannot, K., Diancourt, L., Vaux, S., Thouverez, M., Ribeiro, A., Coignard, B., Courvalin, P., and Brisse, S. (2014). Molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible Acinetobacter baumannii in France. PloS One *9*, e115452.

Jiang, X., Yu, T., Jiang, X., Zhang, W., Zhang, L., and Ma, J. (2014). Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical isolates of Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa in Henan, China. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. *79*, 381–383.

Jung, J., and Park, W. (2015). Acinetobacter species as model microorganisms in environmental microbiology: current state and perspectives. Appl. Microbiol. Biotechnol.

Kaase, M., Nordmann, P., Wichelhaus, T.A., Gatermann, S.G., Bonnin, R.A., and Poirel, L. (2011). NDM-2 carbapenemase in Acinetobacter baumannii from Egypt. J. Antimicrob. Chemother. *66*, 1260–1262.

Kaase, M., Szabados, F., Pfennigwerth, N., Anders, A., Geis, G., Pranada, A.B., Rößler, S., Lang, U., and Gatermann, S.G. (2014). Description of the metallo-β-lactamase GIM-1 in Acinetobacter pittii. J. Antimicrob. Chemother. *69*, 81–84.

Kamolvit, W., Higgins, P.G., Paterson, D.L., and Seifert, H. (2014). Multiplex PCR to detect the genes encoding naturally occurring oxacillinases in Acinetobacter spp. J. Antimicrob. Chemother. *69*, 959–963.

Kang, Y.-S., Jung, J., Jeon, C.O., and Park, W. (2011). Acinetobacter oleivorans sp. nov. is capable of adhering to and growing on diesel-oil. J. Microbiol. Seoul Korea *49*, 29–34.

Kansakar, P., Dorji, D., Chongtrakool, P., Mingmongkolchai, S., Mokmake, B., and Dubbs, P. (2011). Local dissemination of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii clones in a Thai hospital. Microb. Drug Resist. Larchmt. N *17*, 109–119.

Kappstein, I., Grundmann, H., Hauer, T., and Niemeyer, C. (2000). Aerators as a reservoir of Acinetobacter junii: an outbreak of bacteraemia in paediatric oncology patients. J. Hosp. Infect. *44*, 27–30.

Karageorgopoulos, D.E., and Falagas, M.E. (2008). Current control and treatment of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii infections. Lancet Infect. Dis. *8*, 751–762.

Karah, N., Giske, C.G., Sundsfjord, A., and Samuelsen, Ø. (2011). A diversity of OXA-carbapenemases and class 1 integrons among carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii clinical isolates from Sweden belonging to different international clonal lineages. Microb. Drug Resist. Larchmt. N *17*, 545–549.

Karah, N., Sundsfjord, A., Towner, K., and Samuelsen, Ø. (2012). Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of Acinetobacter baumannii. Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother. *15*, 237–247.

Karah, N., Samuelsen, Ø., Zarrilli, R., Sahl, J.W., Wai, S.N., and Uhlin, B.E. (2015). CRISPR-cas subtype I-Fb in Acinetobacter baumannii: evolution and utilization for strain subtyping. PloS One *10*, e0118205.

Karah, N., Haldorsen, B., Hegstad, K., Simonsen, G.S., Sundsfjord, A., and Samuelsen, O., on behalf of the Norwegian Study Group of Acinetobacter (2011). Species identification and molecular characterization of Acinetobacter spp. blood culture isolates from Norway. J. Antimicrob. Chemother. *66*, 738–744.

Karthikeyan, K., Thirunarayan, M.A., and Krishnan, P. (2010). Coexistence of blaOXA-23 with blaNDM-1 and armA in clinical isolates of Acinetobacter baumannii from India. J. Antimicrob. Chemother. *65*, 2253–2254.

Kempf, M., and Rolain, J.-M. (2012). Emergence of resistance to carbapenems in Acinetobacter baumannii in Europe: clinical impact and therapeutic options. Int. J. Antimicrob. Agents *39*, 105–114.

Kempf, M., Rolain, J.-M., Diatta, G., Azza, S., Samb, B., Mediannikov, O., Gassama Sow, A., Diene, S.M., Fenollar, F., and Raoult, D. (2012a). Carbapenem resistance and Acinetobacter baumannii in Senegal: the paradigm of a common phenomenon in natural reservoirs. PloS One *7*, e39495.

Kempf, M., Abdissa, A., Diatta, G., Trape, J.-F., Angelakis, E., Mediannikov, O., La Scola, B., and Raoult, D. (2012b). Detection of Acinetobacter baumannii in human head and body lice from Ethiopia and identification of new genotypes. Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis. *16*, e680–683.

Kilic, A., Li, H., Mellmann, A., Basustaoglu, A.C., Kul, M., Senses, Z., Aydogan, H., Stratton, C.W., Harmsen, D., and Tang, Y.-W. (2008). Acinetobacter septicus sp. nov. Association with a Nosocomial Outbreak of Bacteremia in a Neonatal Intensive Care Unit. J. Clin. Microbiol. *46*, 902–908.

Kim, C.-K., Lee, Y., Lee, H., Woo, G.-J., Song, W., Kim, M.-N., Lee, W.-G., Jeong, S.H., Lee, K., and Chong, Y. (2010). Prevalence and diversity of carbapenemases among imipenem-nonsusceptible Acinetobacter isolates in Korea: emergence of a novel OXA-182. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. *68*, 432–438.

Kim, D., Baik, K.S., Kim, M.S., Park, S.C., Kim, S.S., Rhee, M.S., Kwak, Y.S., and Seong, C.N. (2008). Acinetobacter soli sp. nov., isolated from forest soil. J. Microbiol. Seoul Korea *46*, 396–401.

Kim, P.S., Shin, N.-R., Kim, J.Y., Yun, J.-H., Hyun, D.-W., and Bae, J.-W. (2014a). Acinetobacter apis sp. nov., isolated from the intestinal tract of a honey bee, Apis mellifera. J. Microbiol. Seoul Korea *52*, 639–645.

Kim, S.W., Choi, C.H., Moon, D.C., Jin, J.S., Lee, J.H., Shin, J.-H., Kim, J.M., Lee, Y.C., Seol, S.Y., Cho, D.T., *et al.* (2009). Serum resistance of Acinetobacter baumannii through the binding of factor H to outer membrane proteins. FEMS Microbiol. Lett. *301*, 224–231.

Kim, U.J., Kim, H.K., An, J.H., Cho, S.K., Park, K.-H., and Jang, H.-C. (2014b). Update on the Epidemiology, Treatment, and Outcomes of Carbapenem-resistant *Acinetobacter infections*. Chonnam Med. J. *50*, 37.

Kishii, K., Kikuchi, K., Matsuda, N., Yoshida, A., Okuzumi, K., Uetera, Y., Yasuhara, H., and Moriya, K. (2014). Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for species identification of Acinetobacter strains isolated from blood cultures. Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis. *20*, 424–430.

Koh, T.H., Sng, L.-H., Wang, G.C.Y., Hsu, L.-Y., and Zhao, Y. (2007). IMP-4 and OXA beta-lactamases in Acinetobacter baumannii from Singapore. J. Antimicrob. Chemother. *59*, 627–632.

Kolayli, F., Gacar, G., Karadenizli, A., Sanic, A., and Vahaboglu, H., Study Group (2005). PER-1 is still widespread in Turkish hospitals among Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter spp. FEMS Microbiol. Lett. *249*, 241–245.

Kouyama, Y., Harada, S., Ishii, Y., Saga, T., Yoshizumi, A., Tateda, K., and Yamaguchi, K. (2012). Molecular characterization of carbapenem-non-susceptible Acinetobacter spp. in Japan: predominance of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii clonal complex 92 and IMP-type metallo-β-lactamase-producing non-baumannii Acinetobacter species. J. Infect. Chemother. Off. J. Jpn. Soc. Chemother. *18*, 522–528.

Krizova, L., Maixnerova, M., Sedo, O., and Nemec, A. (2014). Acinetobacter bohemicus sp. nov. widespread in natural soil and water ecosystems in the Czech Republic. Syst. Appl. Microbiol. *37*, 467–473.

Krizova, L., Maixnerova, M., Sedo, O., and Nemec, A. (2015a). Acinetobacter albensis sp. nov., isolated from natural soil and water ecosystems. Int. J. Syst. Evol. Microbiol.

Krizova, L., McGinnis, J., Maixnerova, M., Nemec, M., Poirel, L., Mingle, L., Sedo, O., Wolfgang, W., and Nemec, A. (2015b). Acinetobacter variabilis sp. nov. (formerly DNA group 15 sensu Tjernberg & Ursing), isolated from humans and animals. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. *65*, 857–863.

Kurcik-Trajkovska, B. (2010). Acinetobacter spp. - A Serious Enemy Threatening Hospitals Worldwide. Maced. J. Med. Sci. *2*, 157–162.

Lauretti, L., Riccio, M.L., Mazzariol, A., Cornaglia, G., Amicosante, G., Fontana, R., and Rossolini, G.M. (1999). Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a Pseudomonas aeruginosa clinical isolate. Antimicrob. Agents Chemother. *43*, 1584–1590.

Lee, H.-J., and Lee, S.-S. (2010). Acinetobacter kyonggiensis sp. nov., a β-glucosidase-producing bacterium, isolated from sewage treatment plant. J. Microbiol. Seoul Korea *48*, 754–759.

Lee, J.H., Choi, C.H., Kang, H.Y., Lee, J.Y., Kim, J., Lee, Y.C., Seol, S.Y., Cho, D.T., Kim, K.W., Song, D.Y., *et al.* (2007). Differences in phenotypic and genotypic traits against antimicrobial agents between Acinetobacter baumannii and Acinetobacter genomic species 13TU. J. Antimicrob. Chemother. *59*, 633–639.

Lee, J.-S., Lee, K.C., Kim, K.K., Hwang, I.C., Jang, C., Kim, N.G., Yeo, W.H., Kim, B.S., Yu, Y.M., and Ahn, J.S. (2009a). Acinetobacter antiviralis sp. nov., from Tobacco plant roots. J. Microbiol. Biotechnol. *19*, 250–256.

Lee, K., Yum, J.H., Yong, D., Lee, H.M., Kim, H.D., Docquier, J.-D., Rossolini, G.M., and Chong, Y. (2005). Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, bla(SIM-1), in a class 1 integron from Acinetobacter baumannii clinical isolates from Korea. Antimicrob. Agents Chemother. *49*, 4485–4491.

Lee, M.J., Jang, S.J., Li, X.M., Park, G., Kook, J.-K., Kim, M.J., Chang, Y.-H., Shin, J.H., Kim, S.H., Kim, D.-M., *et al.* (2014). Comparison of rpoB gene sequencing, 16S rRNA gene sequencing, gyrB multiplex PCR, and the VITEK2 system for identification of Acinetobacter clinical isolates. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. *78*, 29–34.

Lee, Y., Yum, J.H., Kim, C.-K., Yong, D., Jeon, E.H., Jeong, S.H., Ahn, J.Y., and Lee, K. (2010). Role of OXA-23 and AdeABC efflux pump for acquiring carbapenem resistance in an Acinetobacter baumannii strain carrying the blaOXA-66 gene. Ann. Clin. Lab. Sci. *40*, 43–48.

Lee, Y., Kim, Y.-R., Kim, J., Park, Y.-J., Song, W., Shin, J.-H., Uh, Y., Lee, K., Lee, S.H., Cho, J.H., *et al.* (2013). Increasing prevalence of blaOXA-23-carrying Acinetobacter baumannii and the emergence of blaOXA-182-carrying Acinetobacter nosocomialis in Korea. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. *77*, 160–163.

Lee, Y.-C., Huang, Y.-T., Tan, C.-K., Kuo, Y.-W., Liao, C.-H., Lee, P.-I., and Hsueh, P.-R. (2011). Acinetobacter baumannii and Acinetobacter genospecies 13TU and 3 bacteraemia: comparison of clinical features, prognostic factors and outcomes. J. Antimicrob. Chemother. *66*, 1839–1846.

Lee, Y.-T., Huang, L.-Y., Chiang, D.-H., Chen, C.-P., Chen, T.-L., Wang, F.-D., Fung, C.-P., Siu, L.-K., and Cho, W.-L. (2009b). Differences in phenotypic and genotypic characteristics among imipenem-non-susceptible Acinetobacter isolates belonging to different genomic species in Taiwan. Int. J. Antimicrob. Agents *34*, 580–584.

Lee, Y.-T., Kuo, S.-C., Chiang, M.-C., Yang, S.-P., Chen, C.-P., Chen, T.-L., and Fung, C.-P. (2012). Emergence of carbapenem-resistant non-baumannii species of Acinetobacter harboring a blaOXA-51-like gene that is intrinsic to A. baumannii. Antimicrob. Agents Chemother. *56*, 1124–1127.

Lee, K., Kim, M.-N., Choi, T.Y., Cho, S.-E., Lee, S., Whang, D.H., Yong, D., Chong, Y., Woodford, N., and Livermore, D.M., KONSAR Group (2009). Wide dissemination of OXA-type carbapenemases in clinical Acinetobacter spp. isolates from South Korea. Int. J. Antimicrob. Agents *33*, 520–524.

Lee, K., Lee, W.G., Uh, Y., Ha, G.Y., Cho, J., and Chong, Y., Korean Nationwide Surveillance of Antimicrobial Resistance Group (2003). VIM- and IMP-type metallo-beta-lactamase-producing Pseudomonas spp. and Acinetobacter spp. in Korean hospitals. Emerg. Infect. Dis. *9*, 868–871.

Lewis, T., Loman, N.J., Bingle, L., Jumaa, P., Weinstock, G.M., Mortiboy, D., and Pallen, M.J. (2010). High-throughput whole-genome sequencing to dissect the epidemiology of Acinetobacter baumannii isolates from a hospital outbreak. J. Hosp. Infect. *75*, 37–41.

Li, G., Yang, M., Zhou, K., Zhang, L., Tian, L., Lv, S., Jin, Y., Qian, W., Xiong, H., Lin, R., *et al.* (2015a). Diversity of Duodenal and Rectal Microbiota in Biopsy Tissues and Luminal Contents in Healthy Volunteers. J. Microbiol. Biotechnol. *25*, 1136–1145.

Li, P., Yang, C., Xie, J., Liu, N., Wang, H., Zhang, L., Wang, X., Wang, Y., Qiu, S., and Song, H. (2015b). Acinetobacter calcoaceticus from a fatal case of pneumonia harboring blaNDM-1 on a widely distributed plasmid. BMC Infect. Dis. *15*.

Li, W., Zhang, D., Huang, X., and Qin, W. (2014a). Acinetobacter harbinensis sp. nov., isolated from river water. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. *64*, 1507–1513.

Li, Y., Piao, C., Ma, Y., He, W., Wang, H., Chang, J., Guo, L., Wang, X., Xie, S., and Guo, M. (2013). Acinetobacter puyangensis sp. nov., isolated from the healthy and diseased part of Populus xeuramericana canker bark. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. *63*, 2963–2969.

Li, Y., He, W., Wang, T., Piao, C., Guo, L., Chang, J., Guo, M.-W., and Xie, S. (2014b). Acinetobacter qingfengensis sp. nov., isolated from canker bark of Populus x euramericana. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. *64*, 1043–1050.

Li, Y., Chang, J., Guo, L.-M., Wang, H.-M., Xie, S.-J., Piao, C.-G., and He, W. (2015c). Description of Acinetobacter populi sp. nov. isolated from symptomatic bark of Populus ×euramericana canker. Int. J. Syst. Evol. Microbiol.

Lin, L., Tan, B., Pantapalangkoor, P., Ho, T., Baquir, B., Tomaras, A., Montgomery, J.I., Reilly, U., Barbacci, E.G., Hujer, K., *et al.* (2012). Inhibition of LpxC protects mice from resistant Acinetobacter baumannii by modulating inflammation and enhancing phagocytosis. mBio *3*.

Lin, M.-F., Lin, Y.-Y., and Lan, C.-Y. (2017). Contribution of EmrAB efflux pumps to colistin resistance in Acinetobacter baumannii. J. Microbiol. Seoul Korea *55*, 130–136.

Lin, Y.-C., Sheng, W.-H., Chen, Y.-C., Chang, S.-C., Hsia, K.-C., and Li, S.-Y. (2010). Differences in carbapenem resistance genes among Acinetobacterbaumannii, Acinetobacter genospecies 3 and Acinetobacter genospecies 13TU in Taiwan. Int. J. Antimicrob. Agents *35*, 439–443.

Lindstedt, B.-A. (2005). Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. Electrophoresis *26*, 2567–2582.

Liu, L.-L., Ji, S.-J., Ruan, Z., Fu, Y., Fu, Y.-Q., Wang, Y.-F., and Yu, Y.-S. (2015). Dissemination of blaOXA-23 in Acinetobacter spp. in China: Main Roles of Conjugative Plasmid pAZJ221 and Transposon Tn2009. Antimicrob. Agents Chemother. *59*, 1998–2005.

Liu, S., Wang, Y., Ruan, Z., Ma, K., Wu, B., Xu, Y., Wang, J., You, Y., He, M., and Hu, G. (2016). Acinetobacter larvae sp. nov., isolated from the larval gut of Omphisa fuscidentalis. Int. J. Syst. Evol. Microbiol.

Loehfelm, T.W., Luke, N.R., and Campagnari, A.A. (2008). Identification and characterization of an Acinetobacter baumannii biofilm-associated protein. J. Bacteriol. *190*, 1036–1044.

Lolans, K., Rice, T.W., Munoz-Price, L.S., and Quinn, J.P. (2006). Multicity outbreak of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii isolates producing the carbapenemase OXA-40. Antimicrob. Agents Chemother. *50*, 2941–2945.

Lopes, B.S., Evans, B.A., and Amyes, S.G.B. (2012). Disruption of the blaOXA-51-like gene by ISAba16 and activation of the blaOXA-58 gene leading to carbapenem resistance in Acinetobacter baumannii Ab244. J. Antimicrob. Chemother. *67*, 59–63.

Luke, N.R., Sauberan, S.L., Russo, T.A., Beanan, J.M., Olson, R., Loehfelm, T.W., Cox, A.D., St Michael, F., Vinogradov, E.V., and Campagnari, A.A. (2010). Identification and characterization of a glycosyltransferase involved in Acinetobacter baumannii lipopolysaccharide core biosynthesis. Infect. Immun. *78*, 2017–2023.

Lupo, A., Châtre, P., Ponsin, C., Saras, E., Jean-Boulouis, H., Keck, N., Haenni, M., and Madec, J.-Y. (2016). Clonal Spread of blaOXA-23ST25 Acinetobacter baumannii in Companion Animals in France. Antimicrob. Agents Chemother.

Máder, K., Terhes, G., Hajdú, E., Urbán, E., Sóki, J., Magyar, T., Márialigeti, K., Katona, M., Nagy, E., and Túri, S. (2010). Outbreak of septicaemic cases caused by Acinetobacter ursingii in a neonatal intensive care unit. Int. J. Med. Microbiol. IJMM *300*, 338–340.

Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., *et al.* (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and

pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis. *18*, 268–281.

Malhotra, J., Anand, S., Jindal, S., Rajagopal, R., and Lal, R. (2012). Acinetobacter indicus sp. nov., isolated from a hexachlorocyclohexane dump site. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. *62*, 2883–2890.

Mammina, C., Bonura, C., Aleo, A., Calà, C., Caputo, G., Cataldo, M.C., Di Benedetto, A., Distefano, S., Fasciana, T., Labisi, M., *et al.* (2011). Characterization of Acinetobacter baumannii from intensive care units and home care patients in Palermo, Italy. Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis. *17*, E12–15.

Manji, R., Bythrow, M., Branda, J.A., Burnham, C. -a. D., Ferraro, M.J., Garner, O.B., Jennemann, R., Lewinski, M.A., Mochon, A.B., Procop, G.W., *et al.* (2014). Multi-center evaluation of the VITEK® MS system for mass spectrometric identification of non-Enterobacteriaceae Gram-negative bacilli. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. *33*, 337–346.

Marqué, S., Poirel, L., Héritier, C., Brisse, S., Blasco, M.D., Filip, R., Coman, G., Naas, T., and Nordmann, P. (2005). Regional Occurrence of Plasmid-Mediated Carbapenem-Hydrolyzing Oxacillinase OXA-58 in Acinetobacter spp. in Europe. J. Clin. Microbiol. *43*, 4885–4888.

Marti, S., Sánchez-Céspedes, J., Blasco, M.D., Ruiz, M., Espinal, P., Alba, V., Fernández-Cuenca, F., Pascual, A., and Vila, J. (2008a). Characterization of the Carbapenem-Hydrolyzing Oxacillinase Oxa-58 in an Acinetobacter Genospecies 3 Clinical Isolate. Antimicrob. Agents Chemother. *52*, 2955–2958.

Marti, S., Sánchez-Céspedes, J., Blasco, M.D., Espinal, P., Ruiz, M., Alba, V., and Vila, J. (2008b). Characterization of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-58 in an Acinetobacter phenon 6/ct13TU clinical isolate. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. *61*, 468–470.

Martín-Lozano, D., Cisneros, J.M., Becerril, B., Cuberos, L., Prados, T., Ortíz-Leyba, C., Cañas, E., and Pachón, J. (2002). Comparison of a repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR method and clinical and microbiological methods for determining strain sources in cases of nosocomial Acinetobacter baumannii bacteremia. J. Clin. Microbiol. *40*, 4571–4575.

Matar, G.M., Gay, E., Cooksey, R.C., Elliott, J.A., Heneine, W.M., Uwaydah, M.M., Matossian, R.M., and Tenover, F.C. (1992). Identification of an epidemic strain of Acinetobacter baumannii using electrophoretic typing methods. Eur. J. Epidemiol. *8*, 9–14.

Mathlouthi, N., Areig, Z., Al Bayssari, C., Bakour, S., Ali El Salabi, A., Ben Gwierif, S., Zorgani, A.A., Ben Slama, K., Chouchani, C., and Rolain, J.-M. (2015). Emergence of Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates Collected from Some Libyan Hospitals. Microb. Drug Resist. *21*, 335–341.

Mathlouthi, N., El Salabi, A.A., Ben Jomàa-Jemili, M., Bakour, S., Al-Bayssari, C., Zorgani, A.A., Kraiema, A., Elahmer, O., Okdah, L., Rolain, J.-M., *et al.* (2016). Early detection of metallo-β-lactamase NDM-1- and OXA-23 carbapenemase-producing Acinetobacter baumannii in Libyan hospitals. Int. J. Antimicrob. Agents *48*, 46–50.

McConnell, M.J., Actis, L., and Pachón, J. (2013). Acinetobacter baumannii: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. FEMS Microbiol. Rev. *37*, 130–155.

McGann, P., Milillo, M., Clifford, R.J., Snesrud, E., Stevenson, L., Backlund, M.G., Viscount, H.B., Quintero, R., Kwak, Y.I., Zapor, M.J., *et al.* (2013a). Detection of New Delhi Metallo-β-Lactamase (Encoded by blaNDM-1) in Acinetobacter schindleri during Routine Surveillance. J. Clin. Microbiol. *51*, 1942–1944.

McGann, P., Milillo, M., Clifford, R.J., Snesrud, E., Stevenson, L., Backlund, M.G., Viscount, H.B., Quintero, R., Kwak, Y.I., Zapor, M.J., *et al.* (2013b). Detection of New Delhi Metallo-β-Lactamase (Encoded by blaNDM-1) in Acinetobacter schindleri during Routine Surveillance. J. Clin. Microbiol. *51*, 1942–1944.

McQueary, C.N., Kirkup, B.C., Si, Y., Barlow, M., Actis, L.A., Craft, D.W., and Zurawski, D.V. (2012). Extracellular stress and lipopolysaccharide modulate Acinetobacter baumannii surface-associated motility. J. Microbiol. Seoul Korea *50*, 434–443.

Mencacci, A., Monari, C., Leli, C., Merlini, L., De Carolis, E., Vella, A., Cacioni, M., Buzi, S., Nardelli, E., Bistoni, F., *et al.* (2013). Typing of nosocomial outbreaks of Acinetobacter baumannii by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J. Clin. Microbiol. *51*, 603–606.

Mendes, R.E., Bell, J.M., Turnidge, J.D., Castanheira, M., Deshpande, L.M., and Jones, R.N. (2009). Codetection of blaOXA-23-Like Gene (blaOXA-133) and blaOXA-58 in Acinetobacter radioresistens: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Antimicrob. Agents Chemother. *53*, 843–844.

Merino, M., Acosta, J., Poza, M., Sanz, F., Beceiro, A., Chaves, F., and Bou, G. (2010). OXA-24 Carbapenemase Gene Flanked by XerC/XerD-Like Recombination Sites in Different Plasmids from Different Acinetobacter Species Isolated during a Nosocomial Outbreak. Antimicrob. Agents Chemother. *54*, 2724–2727.

Merino, M., Poza, M., Roca, I., Barba, M.J., Sousa, M.D., Vila, J., and Bou, G. (2014). Nosocomial outbreak of a multiresistant Acinetobacter baumannii expressing OXA-23 carbapenemase in Spain. Microb. Drug Resist. Larchmt. N *20*, 259–263.

Minandri, F., D'Arezzo, S., Antunes, L.C.S., Pourcel, C., Principe, L., Petrosillo, N., and Visca, P. (2012). Evidence of diversity among epidemiologically related carbapenemase-producing Acinetobacter baumannii strains belonging to international clonal lineage II. J. Clin. Microbiol. *50*, 590–597.

Moffatt, J.H., Harper, M., Harrison, P., Hale, J.D.F., Vinogradov, E., Seemann, T., Henry, R., Crane, B., St Michael, F., Cox, A.D., *et al.* (2010). Colistin resistance in Acinetobacter baumannii is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. Antimicrob. Agents Chemother. *54*, 4971–4977.

Molina, J., Cisneros, J.M., Fernández-Cuenca, F., Rodríguez-Baño, J., Ribera, A., Beceiro, A., Martínez-Martínez, L., Pascual, Á., Bou, G., Vila, J., *et al.*, Spanish Group for Nosocomial Infection (GEIH) (2010). Clinical features of infections and colonization by Acinetobacter genospecies 3. J. Clin. Microbiol. *48*, 4623–4626.

Montealegre, M.C., Maya, J.J., Correa, A., Espinal, P., Mojica, M.F., Ruiz, S.J., Rosso, F., Vila, J., Quinn, J.P., and Villegas, M.V. (2012). First Identification of OXA-72 Carbapenemase from Acinetobacter pittii in Colombia. Antimicrob. Agents Chemother. *56*, 3996–3998.

Montravers, P., Bassetti, M., Dupont, H., Eckmann, C., Heizmann, W.R., Guirao, X., García, M.S., Capparella, M.R., Simoneau, D., and Bodmann, K.F. (2013). Efficacy of tigecycline for the treatment of complicated skin and soft-tissue infections in real-life clinical practice from five European observational studies. J. Antimicrob. Chemother. *68 Suppl 2*, ii15–24.

Vaz-Moreira, I., Novo, A., Hantsis-Zacharov, E., Lopes, A.R., Gomila, M., Nunes, O.C., Manaia, C.M., and Halpern, M. (2011). Acinetobacter rudis sp. nov., isolated from raw milk and raw wastewater. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. *61*, 2837–2843.

Mortensen, B.L., and Skaar, E.P. (2013). The contribution of nutrient metal acquisition and metabolism to Acinetobacter baumannii survival within the host. Front. Cell. Infect. Microbiol. *3*, 95.

Mosqueda, N., Espinal, P., Cosgaya, C., Viota, S., Plasensia, V., Alvarez-Lerma, F., Montero, M., Gómez, J., Horcajada, J.P., Vila, J., *et al.* (2013). Globally expanding carbapenemase finally appears in Spain: nosocomial outbreak of acinetobacter baumannii producing plasmid-encoded OXA-23 in Barcelona, Spain. Antimicrob. Agents Chemother. *57*, 5155–5157.

Mostachio, A.K., Levin, A.S., Rizek, C., Rossi, F., Zerbini, J., and Costa, S.F. (2012). High prevalence of OXA-143 and alteration of outer membrane proteins in carbapenem-resistant Acinetobacter spp. isolates in Brazil. Int. J. Antimicrob. Agents *39*, 396–401.

Moubareck, C., Brémont, S., Conroy, M.-C., Courvalin, P., and Lambert, T. (2009). GES-11, a novel integron-associated GES variant in Acinetobacter baumannii. Antimicrob. Agents Chemother. *53*, 3579–3581.

Mugnier, P.D., Poirel, L., Naas, T., and Nordmann, P. (2010). Worldwide dissemination of the blaOXA-23 carbapenemase gene of Acinetobacter baumannii. Emerg. Infect. Dis. *16*, 35–40.

Mussi, M.A., Limansky, A.S., and Viale, A.M. (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*, 1432–1440.

Naas, T., Namdari, F., Réglier-Poupet, H., Poyart, C., and Nordmann, P. (2007). Panresistant extended-spectrum beta-lactamase SHV-5-producing Acinetobacter baumannii from New York City. J. Antimicrob. Chemother. *60*, 1174–1176.

Naas, T., Coignard, B., Carbonne, A., Blanckaert, K., Bajolet, O., Bernet, C., Verdeil, X., Astagneau, P., Desenclos, J.-C., and Nordmann, P., French Nosocomial Infection Early Warning Investigation and Surveillance Network (2006). VEB-1 Extended-spectrum beta-lactamase-producing Acinetobacter baumannii, France. Emerg. Infect. Dis. *12*, 1214–1222.

Nagano, N., Nagano, Y., Cordevant, C., Shibata, N., and Arakawa, Y. (2004). Nosocomial transmission of CTX-M-2 beta-lactamase-producing Acinetobacter baumannii in a neurosurgery ward. J. Clin. Microbiol. *42*, 3978–3984.

Naiemi, N.A., Duim, B., Savelkoul, P.H.M., Spanjaard, L., de Jonge, E., Bart, A., Vandenbroucke-Grauls, C.M., and de Jong, M.D. (2005). Widespread transfer of resistance genes between bacterial species in an intensive care unit: implications for hospital epidemiology. J. Clin. Microbiol. *43*, 4862–4864.

Nam, H.M., Lim, S.K., Kang, H.M., Kim, J.M., Moon, J.S., Jang, K.C., Kim, J.M., Joo, Y.S., and Jung, S.C. (2009). Prevalence and antimicrobial susceptibility of gram-negative bacteria isolated from bovine mastitis between 2003 and 2008 in Korea. J. Dairy Sci. *92*, 2020–2026.

Ndegwa, E.N., Mulei, C.M., and Munyua, S.J. (2001). Prevalence of microorganisms associated with udder infections in dairy goats on small-scale farms in Kenya. J. S. Afr. Vet. Assoc. *72*, 97–98.

Nemec, A., and Radolfova-Krizova, L. (2016). Acinetobacter pakistanensis Abbas *et al.* 2014 is a later heterotypic synonym of Acinetobacter bohemicus Krizova *et al.* 2014. Int. J. Syst. Evol. Microbiol.

Nemec, A., De Baere, T., Tjernberg, I., Vaneechoutte, M., van der Reijden, T.J., and Dijkshoorn, L. (2001). Acinetobacter ursingii sp. nov. and Acinetobacter schindleri sp. nov., isolated from human clinical specimens. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. *51*, 1891–1899.

Nemec, A., Dijkshoorn, L., Cleenwerck, I., De Baere, T., Janssens, D., Van Der Reijden, T.J.K., Jezek, P., and Vaneechoutte, M. (2003). Acinetobacter parvus sp. nov., a small-colony-forming species isolated from human clinical specimens. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. *53*, 1563–1567.

Nemec, A., Dijkshoorn, L., and van der Reijden, T.J.K. (2004). Long-term predominance of two pan-European clones among multi-resistant Acinetobacter baumannii strains in the Czech Republic. J. Med. Microbiol. *53*, 147–153.

Nemec, A., Musílek, M., Vaneechoute, M., Falsen, E., and Dijkshoorn, L. (2008). Lack of evidence for "Acinetobacter septicus" as a species different from Acinetobacter ursingii? J. Clin. Microbiol. *46*, 2826–2827; author reply 2827.

Nemec, A., Musílek, M., Maixnerová, M., Baere, T.D., Reijden, T.J.K. van der, Vaneechoutte, M., and Dijkshoorn, L. (2009). Acinetobacter beijerinckii sp. nov. and Acinetobacter gyllenbergii sp. nov., haemolytic organisms isolated from humans. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. *59*, 118–124.

Nemec, A., Musílek, M., Sedo, O., De Baere, T., Maixnerová, M., van der Reijden, T.J.K., Zdráhal, Z., Vaneechoutte, M., and Dijkshoorn, L. (2010). Acinetobacter bereziniae sp. nov. and Acinetobacter guillouiae sp. nov., to accommodate Acinetobacter genomic species 10 and 11, respectively. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. *60*, 896–903.

Nemec, A., Krizova, L., Maixnerova, M., van der Reijden, T.J.K., Deschaght, P., Passet, V., Vaneechoutte, M., Brisse, S., and Dijkshoorn, L. (2011). Genotypic and phenotypic characterization of the Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii complex with the proposal of Acinetobacter pittii sp. nov. (formerly Acinetobacter genomic species 3) and Acinetobacter nosocomialis sp. nov. (formerly Acinetobacter genomic species 13TU). Res. Microbiol. *162*, 393–404.

Nemec, A., Krizova, L., Maixnerova, M., Sedo, O., Brisse, S., and Higgins, P.G. (2015). Acinetobacter seifertii sp. nov., a member of the Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii complex isolated from human clinical specimens. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. *65*, 934–942.

Nemec, A., Radolfova-Krizova, L., Maixnerova, M., Vrestiakova, E., Jezek, P., and Sedo, O. (2016). Taxonomy of haemolytic and/or proteolytic strains of the genus Acinetobacter with the proposal of Acinetobacter courvalinii sp. nov. (genomic species 14 sensu Bouvet & Jeanjean), Acinetobacter dispersus sp. nov. (genomic species 17), Acinetobacter modestus sp. nov., Acinetobacter proteolyticus sp. nov. and Acinetobacter vivianii sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. *66*, 1673–1685.

Nishimura, Y., Ino, T., and Iizuka, H. (1988). Acinetobacter radioresistens sp. nov. isolated from cotton and soil. Int. J. Syst. Bacteriol. *38*, 209–211.

Nordmann, P., Dortet, L., and Poirel, L. (2012). Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! Trends Mol. Med. *18*, 263–272.

O'Shea, M.K. (2012). Acinetobacter in modern warfare. Int. J. Antimicrob. Agents *39*, 363–375.

Obuekwe, C.O., Al-Jadi, Z.K., and Al-Saleh, E.S. (2009). Hydrocarbon degradation in relation to cell-surface hydrophobicity among bacterial hydrocarbon degraders from petroleum-contaminated Kuwait desert environment. Int. Biodeterior. Biodegrad. *63*, 273–279.

Opazo, A., Sonnevend, A., Lopes, B., Hamouda, A., Ghazawi, A., Pal, T., and Amyes, S.G.B. (2012). Plasmid-encoded PER-7 β-lactamase responsible for ceftazidime resistance in Acinetobacter baumannii isolated in the United Arab Emirates. J. Antimicrob. Chemother. *67*, 1619–1622.

Ben Othman, A., Zribi, M., Masmoudi, A., Abdellatif, S., Ben Lakhal, S., and Fendri, C. (2011). Multiresistance and endemic status of acinetobacter baumannii associated with nosocomial infections in a tunisian hospital: a critical situation in the intensive care units. Braz. J. Microbiol. Publ. Braz. Soc. Microbiol. *42*, 415–422.

Pagano, M., Poirel, L., Martins, A.F., Rozales, F.P., Zavascki, A.P., Barth, A.L., and Nordmann, P. (2015). Emergence of NDM-1-producing Acinetobacter pittii in Brazil. Int. J. Antimicrob. Agents *45*, 444–445.

Pailhoriès, H., Daure, S., Eveillard, M., Joly-Guillou, M.-L., and Kempf, M. (2015a). Using Vitek MALDI-TOF mass spectrometry to identify species belonging to the Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii complex: a relevant alternative to molecular biology? Diagn. Microbiol. Infect. Dis. *83*, 99–104.

Pailhoriès, H., Belmonte, O., Kempf, M., Lemarié, C., Cuziat, J., Quinqueneau, C., Ramont, C., Joly-Guillou, M.-L., and Eveillard, M. (2015b). Diversity of Acinetobacter baumannii strains isolated in humans, companion animals, and the environment in Reunion Island: an exploratory study. Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis. *37*, 64–69.

Pailhoriès, H., Hadjadj, L., Mahieu, R., Crochette, N., Rolain, J.-M., and Kempf, M. (2016a). Fortuitous diagnosis of NDM-1-producing Acinetobacter pittii carriage in a patient from France with no recent history of travel. J. Antimicrob. Chemother.

Pailhoriès, H., Kempf, M., Belmonte, O., Joly-Guillou, M.-L., and Eveillard, M. (2016b). First case of OXA-24-producing Acinetobacter baumannii in cattle from Reunion Island, France. Int. J. Antimicrob. Agents.

Park, K.-H., Shin, J.-H., Lee, S.Y., Kim, S.H., Jang, M.O., Kang, S.-J., Jung, S.-I., Chung, E.-K., Ko, K.S., and Jang, H.-C. (2013). The Clinical Characteristics, Carbapenem Resistance, and Outcome of Acinetobacter Bacteremia According to Genospecies. PLoS ONE *8*.

Park, Y.K., Peck, K.R., Cheong, H.S., Chung, D.R., Song, J.H., and Ko, K.S. (2009). Extreme drug resistance in Acinetobacter baumannii infections in intensive care units, South Korea. Emerg. Infect. Dis. *15*, 1325–1327.

Pasteran, F., Mora, M.M., Albornoz, E., Faccone, D., Franco, R., Ortellado, J., Melgarejo, N., Gomez, S., Riquelme, I., Matheu, J., *et al.* (2014). Emergence of genetically unrelated NDM-1-producing Acinetobacter pittii strains in Paraguay. J. Antimicrob. Chemother. *69*, 2575–2578.

Pasterán, F., Rapoport, M., Petroni, A., Faccone, D., Corso, A., Galas, M., Vázquez, M., Procopio, A., Tokumoto, M., and Cagnoni, V. (2006). Emergence of PER-2 and VEB-1a in Acinetobacter baumannii Strains in the Americas. Antimicrob. Agents Chemother. *50*, 3222–3224.

Patel, R. (2013). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in clinical microbiology. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. *57*, 564–572.

Peleg, A.Y., Franklin, C., Walters, L.J., Bell, J.M., and Spelman, D.W. (2006). OXA-58 and IMP-4 Carbapenem-Hydrolyzing β-Lactamases in an Acinetobacter junii Blood Culture Isolate from Australia. Antimicrob. Agents Chemother. *50*, 399–400.

Peleg, A.Y., Seifert, H., and Paterson, D.L. (2008). Acinetobacter baumannii: emergence of a successful pathogen. Clin. Microbiol. Rev. *21*, 538–582.

Perez, F., Hujer, A.M., Hujer, K.M., Decker, B.K., Rather, P.N., and Bonomo, R.A. (2007). Global Challenge of Multidrug-Resistant Acinetobacter baumannii. Antimicrob. Agents Chemother. *51*, 3471–3484.

Perez, F., Endimiani, A., Ray, A.J., Decker, B.K., Wallace, C.J., Hujer, K.M., Ecker, D.J., Adams, M.D., Toltzis, P., Dul, M.J., *et al.* (2010). Carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii and Klebsiella pneumoniae across a hospital system: impact of post-acute care facilities on dissemination. J. Antimicrob. Chemother. *65*, 1807–1818.

Périchon, B., Goussard, S., Walewski, V., Krizova, L., Cerqueira, G., Murphy, C., Feldgarden, M., Wortman, J., Clermont, D., Nemec, A., *et al.* (2014). Identification of 50 Class D β-Lactamases and 65 Acinetobacter-Derived Cephalosporinases in Acinetobacter spp. Antimicrob. Agents Chemother. *58*, 936–949.

Petersen, K., Cannegieter, S.C., van der Reijden, T.J., van Strijen, B., You, D.M., Babel, B.S., Philip, A.I., and Dijkshoorn, L. (2011). Diversity and clinical impact of Acinetobacter baumannii colonization and infection at a military medical center. J. Clin. Microbiol. *49*, 159–166.

Pfeifer, Y., Trifonova, A., Pietsch, M., Brunner, M., Todorova, I., Gergova, I., Wilharm, G., Werner, G., and Savov, E. (2016). Clonal Transmission of Gram-Negative Bacteria with Carbapenemases NDM-1, VIM-1, and OXA-23/72 in a Bulgarian Hospital. Microb. Drug Resist. Larchmt. N.

Poirel, L., and Nordmann, P. (2006). Carbapenem resistance in Acinetobacter baumannii: mechanisms and epidemiology. Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis. *12*, 826–836.

Poirel, L., Menuteau, O., Agoli, N., Cattoen, C., and Nordmann, P. (2003). Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase VEB-1-producing isolates of Acinetobacter baumannii in a French hospital. J. Clin. Microbiol. *41*, 3542–3547.

Poirel, L., Marqué, S., Héritier, C., Segonds, C., Chabanon, G., and Nordmann, P. (2005). OXA-58, a novel class D {beta}-lactamase involved in resistance to carbapenems in Acinetobacter baumannii. Antimicrob. Agents Chemother. *49*, 202–208.

Poirel, L., Figueiredo, S., Cattoir, V., Carattoli, A., and Nordmann, P. (2008a). Acinetobacter radioresistens as a Silent Source of Carbapenem Resistance for Acinetobacter spp. Antimicrob. Agents Chemother. *52*, 1252–1256.

Poirel, L., Mansour, W., Bouallegue, O., and Nordmann, P. (2008b). Carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii isolates from Tunisia producing the OXA-58-like carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-97. Antimicrob. Agents Chemother. *52*, 1613–1617.

Poirel, L., Naas, T., and Nordmann, P. (2010). Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. Antimicrob. Agents Chemother. *54*, 24–38.

Di Popolo, A., Giannouli, M., Triassi, M., Brisse, S., and Zarrilli, R. (2011). Molecular epidemiological investigation of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii strains in four Mediterranean countries with a multilocus sequence typing scheme. Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis. *17*, 197–201.

Poppel, M.T., Skiebe, E., Laue, M., Bergmann, H., Ebersberger, I., Garn, T., Fruth, A., Baumgardt, S., Busse, H.-J., and Wilharm, G. (2015). Acinetobacter equi sp. nov. isolated from horse faeces. Int. J. Syst. Evol. Microbiol.

Potron, A., Poirel, L., Croizé, J., Chanteperdrix, V., and Nordmann, P. (2009). Genetic and biochemical characterization of the first extended-spectrum CARB-type beta-lactamase, RTG-4, from Acinetobacter baumannii. Antimicrob. Agents Chemother. *53*, 3010–3016.

Potron, A., Munoz-Price, L.S., Nordmann, P., Cleary, T., and Poirel, L. (2011). Genetic features of CTX-M-15-producing Acinetobacter baumannii from Haiti. Antimicrob. Agents Chemother. *55*, 5946–5948.

Potron, A., Poirel, L., and Nordmann, P. (2015). Emerging broad-spectrum resistance in Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii: Mechanisms and epidemiology. Int. J. Antimicrob. Agents.

Pourcel, C., Minandri, F., Hauck, Y., D'Arezzo, S., Imperi, F., Vergnaud, G., and Visca, P. (2011). Identification of variable-number tandem-repeat (VNTR) sequences in Acinetobacter baumannii and interlaboratory validation of an optimized multiple-locus VNTR analysis typing scheme. J. Clin. Microbiol. *49*, 539–548.

Pournaras, S., Gogou, V., Giannouli, M., Dimitroulia, E., Dafopoulou, K., Tsakris, A., and Zarrilli, R. (2014). Single-locus-sequence-based typing of blaOXA-51-like genes for rapid assignment of Acinetobacter baumannii clinical isolates to international clonal lineages. J. Clin. Microbiol. *52*, 1653–1657.

Prasad, P., Sun, J., Danner, R.L., and Natanson, C. (2012). Excess deaths associated with tigecycline after approval based on noninferiority trials. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. *54*, 1699–1709.

Principe, L., Piazza, A., Giani, T., Bracco, S., Caltagirone, M.S., Arena, F., Nucleo, E., Tammaro, F., Rossolini, G.M., Pagani, L., *et al.*, AMCLI-CRAb Survey participants (2014). Epidemic Diffusion of OXA-23-Producing Acinetobacter baumannii Isolates in Italy: Results of the First Cross-Sectional Countrywide Survey. J. Clin. Microbiol. *52*, 3004–3010.

Radolfova-Krizova, L., Maixnerova, M., and Nemec, A. (2016a). Acinetobacter celticus sp. nov., a psychrotolerant species widespread in natural soil and water ecosystems of Bohemia, Czech Republic. Int. J. Syst. Evol. Microbiol.

Radolfova-Krizova, L., Maixnerova, M., and Nemec, A. (2016b). Acinetobacter pragensis sp. nov. found in soil and water ecosystems of Central Bohemia, Czech Republic. Int. J. Syst. Evol. Microbiol.

Rafei, R., Dabboussi, F., Hamze, M., Eveillard, M., Lemarié, C., Mallat, H., Rolain, J.-M., Joly-Guillou, M.-L., and Kempf, M. (2014a). First report of blaNDM-1-producing Acinetobacter baumannii isolated in Lebanon from civilians wounded during the Syrian war. Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis. *21*, 21–23.

Rafei, R., Kempf, M., Eveillard, M., Dabboussi, F., Hamze, M., and Joly-Guillou, M.-L. (2014b). Current molecular methods in epidemiological typing of Acinetobacter baumannii. Future Microbiol. *9*, 1179–1194.

Rafei, R., Dabboussi, F., Hamze, M., Eveillard, M., Lemarié, C., Gaultier, M.-P., Mallat, H., Moghnieh, R., Husni-Samaha, R., Joly-Guillou, M.-L., *et al.* (2014c). Molecular analysis of Acinetobacter baumannii strains isolated in Lebanon using four different typing methods. PloS One *9*, e115969.

Rafei, R., Hamze, M., Pailhoriès, H., Eveillard, M., Marsollier, L., Joly-Guillou, M.-L., Dabboussi, F., and Kempf, M. (2015a). Extra-human epidemiology of Acinetobacter baumannii in Lebanon. Appl. Environ. Microbiol.

Rafei, R., Pailhoriès, H., Hamze, M., Eveillard, M., Mallat, H., Dabboussi, F., Joly-Guillou, M.-L., and Kempf, M. (2015b). Molecular epidemiology of Acinetobacter baumannii in different hospitals in Tripoli, Lebanon using blaOXA-51-like sequence based typing. BMC Microbiol. *15*.

Reddy, T., Chopra, T., Marchaim, D., Pogue, J.M., Alangaden, G., Salimnia, H., Boikov, D., Navon-Venezia, S., Akins, R., Selman, P., *et al.* (2010). Trends in Antimicrobial Resistance of Acinetobacter baumannii Isolates from a Metropolitan Detroit Health System. Antimicrob. Agents Chemother. *54*, 2235–2238.

Riccio, M.L., Franceschini, N., Boschi, L., Caravelli, B., Cornaglia, G., Fontana, R., Amicosante, G., and Rossolini, G.M. (2000). Characterization of the metallo-beta-lactamase determinant of Acinetobacter baumannii AC-54/97 reveals the existence of bla(IMP) allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. Antimicrob. Agents Chemother. *44*, 1229–1235.

Robledo, I.E., Aquino, E.E., Santé, M.I., Santana, J.L., Otero, D.M., León, C.F., and Vázquez, G.J. (2010). Detection of KPC in Acinetobacter spp. in Puerto Rico. Antimicrob. Agents Chemother. *54*, 1354–1357.

Robledo, I.E., Aquino, E.E., and Vázquez, G.J. (2011). Detection of the KPC gene in Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, and Acinetobacter baumannii during a PCR-based nosocomial surveillance study in Puerto Rico. Antimicrob. Agents Chemother. *55*, 2968–2970.

Roca, I., Espinal, P., Vila-Farrés, X., and Vila, J. (2012). The Acinetobacter baumannii Oxymoron: Commensal Hospital Dweller Turned Pan-Drug-Resistant Menace. Front. Microbiol. *3*, 148.

Roca, I., Mosqueda, N., Altun, B., Espinal, P., Akova, M., and Vila, J. (2014). Molecular characterization of NDM-1-producing Acinetobacter pittii isolated from Turkey in 2006. J. Antimicrob. Chemother. *69*, 3437–3438.

Rooney, A.P., Dunlap, C.A., and Flor-Weiler, L.B. (2016). Acinetobacter lactucae sp. nov., isolated from iceberg lettuce (Asteraceae: Lactuca sativa). Int. J. Syst. Evol. Microbiol.

Rumbo, C., Fernández-Moreira, E., Merino, M., Poza, M., Mendez, J.A., Soares, N.C., Mosquera, A., Chaves, F., and Bou, G. (2011). Horizontal transfer of the OXA-24 carbapenemase gene via outer membrane vesicles: a new mechanism of dissemination of carbapenem resistance genes in Acinetobacter baumannii. Antimicrob. Agents Chemother. *55*, 3084–3090.

Russo, T.A., Luke, N.R., Beanan, J.M., Olson, R., Sauberan, S.L., MacDonald, U., Schultz, L.W., Umland, T.C., and Campagnari, A.A. (2010). The K1 capsular polysaccharide of Acinetobacter baumannii strain 307-0294 is a major virulence factor. Infect. Immun. *78*, 3993–4000.

Sahl, J.W., Del Franco, M., Pournaras, S., Colman, R.E., Karah, N., Dijkshoorn, L., and Zarrilli, R. (2015). Phylogenetic and genomic diversity in isolates from the globally distributed Acinetobacter baumannii ST25 lineage. Sci. Rep. *5*, 15188.

Sarma, P.M., Bhattacharya, D., Krishnan, S., and Lal, B. (2004). Assessment of intra-species diversity among strains of Acinetobacter baumannii isolated from sites contaminated with petroleum hydrocarbons. Can. J. Microbiol. *50*, 405–414.

Schuetz, A.N., Huard, R.C., Eshoo, M.W., Massire, C., Della-Latta, P., Wu, F., and Jenkins, S.G. (2012). Identification of a novel Acinetobacter baumannii clone in a US hospital outbreak by multilocus polymerase chain reaction/electrospray-ionization mass spectrometry. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. *72*, 14–19.

La Scola, B., and Raoult, D. (2004). Acinetobacter baumannii in Human Body Louse. Emerg. Infect. Dis. *10*, 1671–1673.

La Scola, B., Gundi, V.A.K.B., Khamis, A., and Raoult, D. (2006). Sequencing of the rpoB gene and flanking spacers for molecular identification of Acinetobacter species. J. Clin. Microbiol. *44*, 827–832.

Scott, P., Deye, G., Srinivasan, A., Murray, C., Moran, K., Hulten, E., Fishbain, J., Craft, D., Riddell, S., Lindler, L., *et al.* (2007). An outbreak of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii-calcoaceticus complex infection in the US military health care system associated with military operations in Iraq. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. *44*, 1577–1584.

Seifert, H., and Dijkshoorn, L. (2008). "Overview of the Microbial Characteristics, Taxonomy, and Epidemiology of Acinetobacter."In Acinetobacter Biology and Pathogenesis, E. Bergogne-Bérézin, H. Friedman, and M. Bendinelli, eds. (Springer US), pp. 19–45.

Seifert, H., Baginski, R., Schulze, A., and Pulverer, G. (1993). The distribution of Acinetobacter species in clinical culture materials. Zentralblatt Für Bakteriol. Int. J. Med. Microbiol. *279*, 544–552.

Seifert, H., Dijkshoorn, L., Gerner-Smidt, P., Pelzer, N., Tjernberg, I., and Vaneechoutte, M. (1997). Distribution of Acinetobacter species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. J. Clin. Microbiol. *35*, 2819–2825.

Seifert, H., Dolzani, L., Bressan, R., van der Reijden, T., van Strijen, B., Stefanik, D., Heersma, H., and Dijkshoorn, L. (2005). Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of Acinetobacter baumannii. J. Clin. Microbiol. *43*, 4328–4335.

Shakil, S., and Khan, A.U. (2010). Detection of CTX-M-15-producing and carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii strains from urine from an Indian hospital. J. Chemother. Florence Italy *22*, 324–327.

Shibata, N., Doi, Y., Yamane, K., Yagi, T., Kurokawa, H., Shibayama, K., Kato, H., Kai, K., and Arakawa, Y. (2003). PCR typing of genetic determinants for metallo-beta-lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. J. Clin. Microbiol. *41*, 5407–5413.

Shokri, D., Rabbani Khorasgani, M., Fatemi, S.M., and Soleimani-Delfan, A. (2017). Resistotyping, phenotyping and genotyping of New Delhi metallo-β-lactamase (NDM) among gram negative bacilli from Iranian patients. J. Med. Microbiol.

Shrestha, S., Tada, T., Miyoshi-Akiyama, T., Ohara, H., Shimada, K., Satou, K., Teruya, K., Nakano, K., Shiroma, A., Sherchand, J.B., *et al.* (2015). Molecular epidemiology of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii isolates in a university hospital in Nepal reveals the emergence of a novel epidemic clonal lineage. Int. J. Antimicrob. Agents *46*, 526–531.

Da Silva, G.J., Correia, M., Vital, C., Ribeiro, G., Sousa, J.C., Leitão, R., Peixe, L., and Duarte, A. (2002). Molecular characterization of bla(IMP-5), a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from an Acinetobacter baumannii nosocomial isolate in Portugal. FEMS Microbiol. Lett. *215*, 33–39.

Da Silva, G.J., Quinteira, S., Bértolo, E., Sousa, J.C., Gallego, L., Duarte, A., and Peixe, L., Portugese Resistance Study Group (2004). Long-term dissemination of an OXA-40 carbapenemase-producing Acinetobacter baumannii clone in the Iberian Peninsula. J. Antimicrob. Chemother. *54*, 255–258.

Smet, A., Cools, P., Krizova, L., Maixnerova, M., Sedo, O., Haesebrouck, F., Kempf, M., Nemec, A., and Vaneechoutte, M. (2014). Acinetobacter gandensis sp. nov. isolated from horse and cattle. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. *64*, 4007–4015.

Sousa, C., Botelho, J., Silva, L., Grosso, F., Nemec, A., Lopes, J., and Peixe, L. (2014). MALDI-TOF MS and chemometric based identification of the Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii complex species. Int. J. Med. Microbiol. IJMM *304*, 669–677.

Sousa, C., Botelho, J., Grosso, F., Silva, L., Lopes, J., and Peixe, L. (2015). Unsuitability of MALDI-TOF MS to discriminate Acinetobacter baumannii clones under routine experimental conditions. Front. Microbiol. *6*, 481.

Al-Sultan, A.A., Evans, B.A., Aboulmagd, E., Al-Qahtani, A.A., Bohol, M.F.F., Al-Ahdal, M.N., Opazo, A.F., and Amyes, S.G.B. (2015). Dissemination of multiple carbapenem-resistant clones of Acinetobacter baumannii in the Eastern District of Saudi Arabia. Front. Microbiol. *6*.

Sun, Y., Liu, Q., Chen, S., Song, Y., Liu, J., Guo, X., Zhu, L., Ji, X., Xu, L., Zhou, W., *et al.* (2014). Characterization and Plasmid Elimination of NDM-1-Producing Acinetobacter calcoaceticus from China. PLoS ONE *9*.

Sung, J.Y., Koo, S.H., Kim, S., and Kwon, K.C. (2014). Epidemiological Characterizations of Class 1 Integrons from Multidrug-Resistant Acinetobacter Isolates in Daejeon, Korea. Ann. Lab. Med. *34*, 293–299.

Al-Sweih, N.A., Al-Hubail, M., and Rotimi, V.O. (2012). Three distinct clones of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii with high diversity of carbapenemases isolated from patients in two hospitals in Kuwait. J. Infect. Public Health *5*, 102–108.

Tada, T., Miyoshi-Akiyama, T., Kato, Y., Ohmagari, N., Takeshita, N., Hung, N.V., Phuong, D.M., Thu, T.A., Binh, N.G., Anh, N.Q., *et al.* (2013). Emergence of 16S rRNA methylase-producing Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa isolates in hospitals in Vietnam. BMC Infect. Dis. *13*, 251.

Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., and Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J. Clin. Microbiol. *33*, 2233–2239.

Tian, G.-B., Adams-Haduch, J.M., Taracila, M., Bonomo, R.A., Wang, H.-N., and Doi, Y. (2011). Extended-spectrum AmpC cephalosporinase in Acinetobacter baumannii: ADC-56 confers resistance to cefepime. Antimicrob. Agents Chemother. *55*, 4922–4925.

Tjernberg, I., and Ursing, J. (1989). Clinical strains of Acinetobacter classified by DNA-DNA hybridization. APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. *97*, 595–605.

Tomaras, A.P., Dorsey, C.W., Edelmann, R.E., and Actis, L.A. (2003). Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by Acinetobacter baumannii: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. Microbiol. Read. Engl. *149*, 3473–3484.

Tomaras, A.P., Flagler, M.J., Dorsey, C.W., Gaddy, J.A., and Actis, L.A. (2008). Characterization of a two-component regulatory system from Acinetobacter baumannii that controls biofilm formation and cellular morphology. Microbiol. Read. Engl. *154*, 3398–3409.

Tomaschek, F., Higgins, P.G., Stefanik, D., Wisplinghoff, H., and Seifert, H. (2016). Head-to-Head Comparison of Two Multi-Locus Sequence Typing (MLST) Schemes for Characterization of Acinetobacter baumannii Outbreak and Sporadic Isolates. PloS One *11*, e0153014.

Touchon, M., Cury, J., Yoon, E.-J., Krizova, L., Cerqueira, G.C., Murphy, C., Feldgarden, M., Wortman, J., Clermont, D., Lambert, T., *et al.* (2014). The genomic diversification of the whole Acinetobacter genus: origins, mechanisms, and consequences. Genome Biol. Evol. *6*, 2866–2882.

Towner, K.J. (2009). Acinetobacter: an old friend, but a new enemy. J. Hosp. Infect. *73*, 355–363.

Tsakris, A., Ikonomidis, A., Pournaras, S., Tzouvelekis, L.S., Sofianou, D., Legakis, N.J., and Maniatis, A.N. (2006). VIM-1 metallo-beta-lactamase in Acinetobacter baumannii. Emerg. Infect. Dis. *12*, 981–983.

Turton, J.F., Woodford, N., Glover, J., Yarde, S., Kaufmann, M.E., and Pitt, T.L. (2006a). Identification of Acinetobacter baumannii by detection of the blaOXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. J. Clin. Microbiol. *44*, 2974–2976.

Turton, J.F., Ward, M.E., Woodford, N., Kaufmann, M.E., Pike, R., Livermore, D.M., and Pitt, T.L. (2006b). The role of ISAba1 in expression of OXA carbapenemase genes in Acinetobacter baumannii. FEMS Microbiol. Lett. *258*, 72–77.

Turton, J.F., Gabriel, S.N., Valderrey, C., Kaufmann, M.E., and Pitt, T.L. (2007). Use of sequence-based typing and multiplex PCR to identify clonal lineages of outbreak strains of Acinetobacter baumannii. Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis. *13*, 807–815.

Turton, J.F., Matos, J., Kaufmann, M.E., and Pitt, T.L. (2009). Variable number tandem repeat loci providing discrimination within widespread genotypes of Acinetobacter baumannii. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. *28*, 499–507.

Turton, J.F., Shah, J., Ozongwu, C., and Pike, R. (2010). Incidence of Acinetobacter species other than *A.baumannii* among clinical isolates of Acinetobacter: evidence for emerging species. J. Clin. Microbiol. *48*, 1445–1449.

Vahaboglu, H., Oztürk, R., Aygün, G., Coşkunkan, F., Yaman, A., Kaygusuz, A., Leblebicioglu, H., Balik, I., Aydin, K., and Otkun, M. (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*, 2265–2269.

Valencia, R., Arroyo, L.A., Conde, M., Aldana, J.M., Torres, M.-J., Fernández-Cuenca, F., Garnacho-Montero, J., Cisneros, J.M., Ortíz, C., Pachón, J., *et al.* (2009). Nosocomial outbreak of infection with pan-drug-resistant Acinetobacter baumannii in a tertiary care university hospital. Infect. Control Hosp. Epidemiol. *30*, 257–263.

Vali, L., Dashti, K., Opazo-Capurro, A.F., Dashti, A.A., Al Obaid, K., and Evans, B.A. (2015). Diversity of multi-drug resistant Acinetobacter baumannii population in a major hospital in Kuwait. Front. Microbiol. *6*.

Vallenet, D., Nordmann, P., Barbe, V., Poirel, L., Mangenot, S., Bataille, E., Dossat, C., Gas, S., Kreimeyer, A., Lenoble, P., *et al.* (2008). Comparative analysis of Acinetobacters: three genomes for three lifestyles. PloS One *3*, e1805.

Vaneechoutte, M., and De Baere, T. (2008). Taxonomy of the genus Acinetobacter, based on 16S ribosomal RNA gene sequences. In Acinetobacter Molecular Biology, (Caister Academic Press), pp. 35–60.

Vaneechoutte, M., Dijkshoorn, L., Tjernberg, I., Elaichouni, A., de Vos, P., Claeys, G., and Verschraegen, G. (1995). Identification of Acinetobacter genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. J. Clin. Microbiol. *33*, 11–15.

Vaneechoutte, M., De Baere, T., Nemec, A., Musílek, M., van der Reijden, T.J.K., and Dijkshoorn, L. (2008). Reclassification of Acinetobacter grimontii Carr *et al.* 2003 as a later synonym of Acinetobacter junii Bouvet and Grimont 1986. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. *58*, 937–940.

Vaneechoutte, M., Nemec, A., Musílek, M., van der Reijden, T.J.K., van den Barselaar, M., Tjernberg, I., Calame, W., Fani, R., De Baere, T., and Dijkshoorn, L. (2009). Description of Acinetobacter venetianus ex Di Cello *et al.* 1997 sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. *59*, 1376–1381.

Vaneechoutte, M., Dijkshoorn, L., Nemec, A., Kämpfer, P., and Wauters, G. (2011). Acinetobacter, Chryseobacterium, Moraxella, and Other Nonfermentative Gram-Negative Rods*. 714–738.

Villalón, P., Valdezate, S., Medina-Pascual, M.J., Rubio, V., Vindel, A., and Saez-Nieto, J.A. (2011). Clonal diversity of nosocomial epidemic Acinetobacter baumannii strains isolated in Spain. J. Clin. Microbiol. *49*, 875–882.

Villalón, P., Valdezate, S., Cabezas, T., Ortega, M., Garrido, N., Vindel, A., Medina-Pascual, M.J., and Saez-Nieto, J.A. (2015). Endemic and epidemic Acinetobacter baumannii clones: a twelve-year study in a tertiary care hospital. BMC Microbiol. *15*, 47.

Visca, P., Petrucca, A., De Mori, P., Festa, A., Boumis, E., Antinori, A., and Petrosillo, N. (2001). Community-acquired Acinetobacter radioresistens bacteremia in an HIV-positive patient. Emerg. Infect. Dis. *7*, 1032–1035.

Visca, P., Seifert, H., and Towner, K.J. (2011). Acinetobacter infection--an emerging threat to human health. IUBMB Life *63*, 1048–1054.

Vourli, S., Frantzeskaki, F., Meletiadis, J., Stournara, L., Armaganidis, A., Zerva, L., and Dimopoulos, G. (2015). Synergistic interactions between colistin and meropenem against extensively drug-resistant and pandrug-resistant Acinetobacter baumannii isolated from ICU patients. Int. J. Antimicrob. Agents *45*, 670–671.

Walsh, T.R., Toleman, M.A., Poirel, L., and Nordmann, P. (2005). Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? Clin. Microbiol. Rev. *18*, 306–325.

Wang, B., and Sun, D. (2015). Detection of NDM-1 carbapenemase-producing Acinetobacter calcoaceticus and Acinetobacter junii in environmental samples from livestock farms. J. Antimicrob. Chemother. *70*, 611–613.

Wang, H., Guo, P., Sun, H., Wang, H., Yang, Q., Chen, M., Xu, Y., and Zhu, Y. (2007). Molecular epidemiology of clinical isolates of carbapenem-resistant Acinetobacter spp. from Chinese hospitals. Antimicrob. Agents Chemother. *51*, 4022–4028.

Wang, H., Drake, S.K., Yong, C., Gucek, M., Tropea, M., Rosenberg, A.Z., Dekker, J.P., and Suffredini, A.F. (2016). A Novel Peptidomic Approach to Strain Typing of Clinical Acinetobacter baumannii Isolates Using Mass Spectrometry. Clin. Chem. *62*, 866–875.

Wang, Y., Wu, C., Zhang, Q., Qi, J., Liu, H., Wang, Y., He, T., Ma, L., Lai, J., Shen, Z., *et al.* (2012). Identification of New Delhi Metallo-β-lactamase 1 in Acinetobacter lwoffii of Food Animal Origin. PLoS ONE *7*.

Weber, B.S., Harding, C.M., and Feldman, M.F. (2016). Pathogenic Acinetobacter: from the Cell Surface to Infinity and Beyond. J. Bacteriol. *198*, 880–887.

Whitman, T.J., Qasba, S.S., Timpone, J.G., Babel, B.S., Kasper, M.R., English, J.F., Sanders, J.W., Hujer, K.M., Hujer, A.M., Endimiani, A., *et al.* (2008). Occupational Transmission of Acinetobacter baumannii from a United States Serviceman Wounded in Iraq to a Health Care Worker. Clin. Infect. Dis. *47*, 439–443.

Wisplinghoff, H., Hippler, C., Bartual, S.G., Haefs, C., Stefanik, D., Higgins, P.G., and Seifert, H. (2008). Molecular epidemiology of clinical Acinetobacter baumannii and Acinetobacter genomic species 13TU isolates using a multilocus sequencing typing scheme. Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis. *14*, 708–715.

Wolk, D.M., Kaleta, E.J., and Wysocki, V.H. (2012). PCR-electrospray ionization mass spectrometry: the potential to change infectious disease diagnostics in clinical and public health laboratories. J. Mol. Diagn. JMD *14*, 295–304.

Wright, M.S., Haft, D.H., Harkins, D.M., Perez, F., Hujer, K.M., Bajaksouzian, S., Benard, M.F., Jacobs, M.R., Bonomo, R.A., and Adams, M.D. (2014). New insights into dissemination and variation of the health care-associated pathogen Acinetobacter baumannii from genomic analysis. mBio *5*, e00963–00913.

Yamamoto, M., Nagao, M., Matsumura, Y., Matsushima, A., Ito, Y., Takakura, S., and Ichiyama, S. (2011). Interspecies dissemination of a novel class 1 integron carrying blaIMP-19 among Acinetobacter species in Japan. J. Antimicrob. Chemother. *66*, 2480–2483.

Yang, H., Hu, L., Liu, Y., Ye, Y., and Li, J. (2016). Detection of the plasmid-mediated quinolone resistance determinants in clinical isolates of Acinetobacter baumannii in China. J. Chemother. Florence Italy 1–3.

Yang, J., Chen, Y., Jia, X., Luo, Y., Song, Q., Zhao, W., Wang, Y., Liu, H., Zheng, D., Xia, Y., *et al.* (2012). Dissemination and characterization of NDM-1-producing Acinetobacter pittii in an intensive care unit in China. Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis. *18*, E506–513.

Yang, S.-C., Chang, W.-J., Chang, Y.-H., Tsai, Y.-S., Yang, T.-P., Juan, C.-W., and Shiau, M.-Y. (2010). Prevalence of antibiotics resistance and OXA carbapenemases genes in multidrug-resistant Acinetobacter baumannii isolates in central Taiwan. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. *29*, 601–604.

Yong, D., Shin, J.H., Kim, S., Lim, Y., Yum, J.H., Lee, K., Chong, Y., and Bauernfeind, A. (2003). High Prevalence of PER-1 Extended-Spectrum β-Lactamase-Producing Acinetobacter spp. in Korea. Antimicrob. Agents Chemother. *47*, 1749–1751.

Yong, D., Toleman, M.A., Giske, C.G., Cho, H.S., Sundman, K., Lee, K., and Walsh, T.R. (2009). Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in Klebsiella pneumoniae sequence type 14 from India. Antimicrob. Agents Chemother. *53*, 5046–5054.

Yoon, J.-H., Kim, I.-G., and Oh, T.-K. (2007). Acinetobacter marinus sp. nov. and Acinetobacter seohaensis sp. nov., isolated from sea water of the Yellow Sea in Korea. J. Microbiol. Biotechnol. *17*, 1743–1750.

Yum, J.H., Yi, K., Lee, H., Yong, D., Lee, K., Kim, J.M., Rossolini, G.M., and Chong, Y. (2002). Molecular characterization of metallo-b-lactamase-producing Acinetobacter baumannii and Acinetobacter genomospecies 3 from Korea: identification of two new integrons carrying the blaVIM-2 gene cassettes. J. Antimicrob. Chemother. *49*, 837–840.

Yun, H.C., Murray, C.K., Roop, S.A., Hospenthal, D.R., Gourdine, E., and Dooley, D.P. (2006). Bacteria recovered from patients admitted to a deployed U.S. military hospital in Baghdad, Iraq. Mil. Med. *171*, 821–825.

Zander, E., Nemec, A., Seifert, H., and Higgins, P.G. (2012). Association between β-lactamase-encoding bla(OXA-51) variants and DiversiLab rep-PCR-based typing of Acinetobacter baumannii isolates. J. Clin. Microbiol. *50*, 1900–1904.

Zander, E., Higgins, P.G., Fernández-González, A., and Seifert, H. (2013). Detection of intrinsic blaOXA-51-like by multiplex PCR on its own is not reliable for the identification of Acinetobacter baumannii. Int. J. Med. Microbiol. IJMM *303*, 88–89.

Zander, E., Bonnin, R.A., Seifert, H., and Higgins, P.G. (2014). Characterization of blaOXA-143 Variants in Acinetobacter baumannii and Acinetobacter pittii. Antimicrob. Agents Chemother. *58*, 2704–2708.

Zarrilli, R., Vitale, D., Di Popolo, A., Bagattini, M., Daoud, Z., Khan, A.U., Afif, C., and Triassi, M. (2008). A plasmid-borne blaOXA-58 gene confers imipenem resistance to Acinetobacter baumannii isolates from a Lebanese hospital. Antimicrob. Agents Chemother. *52*, 4115–4120.

Zarrilli, R., Pournaras, S., Giannouli, M., and Tsakris, A. (2013). Global evolution of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii clonal lineages. Int. J. Antimicrob. Agents *41*, 11–19.

Zeana, C., Larson, E., Sahni, J., Bayuga, S.J., Wu, F., and Della-Latta, P. (2003). The epidemiology of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii: does the community represent a reservoir? Infect. Control Hosp. Epidemiol. *24*, 275–279.

Zenati, K., Touati, A., Bakour, S., Sahli, F., and Rolain, J.M. (2016). Characterization of NDM-1- and OXA-23-producing Acinetobacter baumannii isolates from inanimate surfaces in a hospital environment in Algeria. J. Hosp. Infect. *92*, 19–26.

Zhang, R., Hu, Y.-Y., Yang, X.-F., Gu, D.-X., Zhou, H.-W., Hu, Q.-F., Zhao, K., Yu, S.-F., and Chen, G.-X. (2014). Emergence of NDM-producing non-baumannii Acinetobacter spp. isolated from China. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. *33*, 853–860.

Zhao, W.-H., and Hu, Z.-Q. (2015). Acquired metallo-β-lactamases and their genetic association with class 1 integrons and ISCR elements in Gram-negative bacteria. Future Microbiol. *10*, 873–887.

Zhou, Z., Guan, R., Yang, Y., Chen, L., Fu, J., Deng, Q., Xie, Y., Huang, Y., Wang, J., Wang, D., *et al.* (2012). Identification of New Delhi metallo-β-lactamase gene (NDM-1) from a clinical isolate of Acinetobacter junii in China. Can. J. Microbiol. *58*, 112–115.

Zimbler, D.L., Penwell, W.F., Gaddy, J.A., Menke, S.M., Tomaras, A.P., Connerly, P.L., and Actis, L.A. (2009). Iron acquisition functions expressed by the human pathogen Acinetobacter baumannii. Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med. *22*, 23–32.

Zong, Z., and Zhang, X. (2013). blaNDM-1-carrying Acinetobacter johnsonii detected in hospital sewage. J. Antimicrob. Chemother. *68*, 1007–1010.

Zordan, S., Prenger-Berninghoff, E., Weiss, R., van der Reijden, T., van den Broek, P., Baljer, G., and Dijkshoorn, L. (2011). Multidrug-resistant Acinetobacter baumannii in veterinary clinics, Germany. Emerg. Infect. Dis. *17*, 1751–1754.

Zowawi, H.M., Sartor, A.L., Sidjabat, H.E., Balkhy, H.H., Walsh, T.R., Al Johani, S.M., AlJindan, R.Y., Alfaresi, M., Ibrahim, E., Al-Jardani, A., *et al.* (2015). Molecular Epidemiology of Carbapenem-Resistant Acinetobacter baumannii Isolates in the Gulf Cooperation Council States: Dominance of OXA-23-Type Producers. J. Clin. Microbiol. *53*, 896–903.

UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

Université Libanaise
Ecole Doctorale
Sciences et Technologie

université angers

Thèse de Doctorat

Ahmad AL ATROUNI

Etude de l'épidémiologie moléculaire et de l'écologie d'*Acinetobacter* spp au Liban

Investigation of the molecular epidemiology and the ecology of *Acinetobacter* spp in Lebanon

Résumé

Les *Acinetobacter* sont des bactéries opportunistes impliquées dans les infections nosocomiales.Le but de ce travail était d'étudier leur épidémiologie et écologie au Liban.Tout d'abord, nous avons analysé 119 souches d'*A.baumannii* isolées de plusieurs hôpitaux. 76.5 % étaient résistantes aux carbapénèmes et le gène OXA-23 était le plus fréquemment trouvé. Le typage par Multilocus sequence typing a montré que le clone international II était majoritairement détecté. L'électrophorèse en champ pulsé a révélé que 72.6% des souches appartenant au ST2 ont été classées dans un même cluster qui semble être prédominant à Beirut et Tripoli. Ensuite, les réservoirs extrahospitaliers ont été investigués sur 2361 prélèvements collectés au Liban. Au total, 171 souches ont été isolées dans l'environnement, les produits alimentaires ainsi que chez l'homme et les animaux. La majorité de ces souches, globalement sensibles aux antibiotiques, était des *Acinetobacter non baumannii*, Seuls 15 *A.baumannii,* de 14 STs différents dont 10 nouveaux ont été isolés. Enfin, nous avons conduit une étude taxonomique approfondie sur plusieurs souches d'*Acinetobacter* non identifiées au rang d'espèce et retrouvées dans notre étude. Nous avons ainsi caractérisé une putative nouvelle espèce. Ce travail a montré que le Liban était un pays à forte endémie d'*A.baumannii* résistants aux carbapénèmes. Nous n'avons toutefois pas mis en évidence de lien entre les souches cliniques et extrahospitalières, les clones correspondants étant globalement différents. D'autres études sont nécessaires pour élucider l'origine des souches multi-résistantes émergeant dans les hôpitaux.

Mots clés
***Acinetobacter* spp, *Acinetobacter baumannii*, Liban, Epidémiologie hospitalière, Réservoirs extrahospitaliers, carbapénémase, typage moléculaire, nouvelle espèce**

Abstract

Acinetobacter spp are opportunistic bacteria widely involved in nosocomial infections. The aim of this work was to study the epidemiology and the ecology of these bacteria in Lebanon. First, we have analyzed 119 clinical strains of *A.baumannii*. 76.5% of them were resistant to carbapenems and the production of OXA-23 was the main mechanism. Multi-locus sequence typing revealed the predominance of international clone II. Pulsed field gel electrophoresis showed that 72.6% of strains belonging to ST2 were classified in the same cluster which appeared to be predominant in Beirut and Tripoli. On the other hands, *Acinetobacter* reservoirs were investigated on 2361 samples collected in Lebanon. A total number of 171 strains have been isolated in the environment, food, humans and animals. The majority of these strains was identified as non *baumannii Acinetobacter* and was susceptible to antibiotics. Besides, typing of *A.baumannii* revealed the presence of 14 STs including 10 new ones. Finally, we tried to describe a novel species by conducting a taxonomic study on several strains isolated in Lebanon and other countries. Although the data may be limited, this work has shown the endemic situation of carbapenem resistant *A.baumannii* circulating in the Lebanese hospitals while the extra hospital ones were different. However, further studies are needed to elucidate the origin of these emerging multidrug resistant strains.

Key Words
***Acinetobacter* spp, *Acinetobacter baumannii*, Lebanon, Hospital Epidemiology, Extra hospital reservoirs, Carbapenemase, Molecular typing, Novel species**