



HAL
open science

Etude du réservoir d'*Acinetobacter baumannii* au Liban

Rayane Rafei

► **To cite this version:**

Rayane Rafei. Etude du réservoir d'*Acinetobacter baumannii* au Liban. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers; Université Libanaise, 2014. Français. NNT: . tel-03182873

HAL Id: tel-03182873

<https://theses.hal.science/tel-03182873v1>

Submitted on 26 Mar 2021

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.

Thèse de Doctorat

Rayane RAFEI

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de L'Université Libanaise / L'Université d'Angers
sous le label de L'Université Libanaise / L'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale : Sciences et Technologie / Biologie-Santé

Discipline : Microbiologie

**Unité de recherche : Laboratoire de Microbiologie Santé et Environnement, centre
AZM pour la recherche en Biotechnologie et ses applications, Tripoli, Liban /
Groupe d'Etude des Interactions Hôte - Pathogène (GEIHP), UPRES-EA 3142,
Angers, France**

Soutenue le 17 septembre 2014

Etude du réservoir d'*Acinetobacter baumannii* au Liban

JURY

Rapporteurs : **Jocelyne CAILLON**, Maître de Conférence des Universités-Praticien Hospitalier, Université de Nantes
Sima TOKAJIAN, Professeur associé, département des sciences naturelles, Ecole des arts et de la science, Université Américaine du Liban

Examineurs : **Marie KEMPF**, Maître de Conférence des Universités-Praticien Hospitalier, Université d'Angers
Monzer HAMZE, Professeur des Universités, Faculté de santé publique, Université Libanaise

Directeurs de Thèse : **Marie-Laure JOLY-GUILLOU**, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Université d'Angers
Fouad DABBOUSSI, Professeur des Universités, Faculté de santé publique, Université Libanaise

RÉSUMÉ

A. baumannii est une bactérie principalement responsable d'infections nosocomiales. Ce travail vise à étudier l'épidémiologie moléculaire de souches cliniques d'origine hospitalière et de souches isolées hors de tout contexte hospitalier au Liban.

Nous avons analysé des souches isolées d'hôpitaux, 66 % étaient résistantes aux carbapénèmes et le gène *bla*_{OXA-23-like} étant prépondérant. Le typage par multi locus sequence typing (MLST) a révélé la prédominance du ST2. Dix sept autres ST(s), dont 6 nouveaux, ont par ailleurs été identifiés. Nous avons réalisé une analyse épidémiologique plus approfondie de 42 souches d'origine nosocomiale. Les résultats ont montré la présence d'un seul clone chez 28 souches réparties à Tripoli et à Beyrouth. L'épidémiologie extra-hospitalière a été étudiée sur des prélèvements collectés dans le Nord du Liban. 42 souches ont été identifiées dans l'environnement et chez des animaux. Contrairement aux souches cliniques, les souches étaient sensibles aux antibiotiques. Les résultats du typage par MLST ont montré la présence de 36 ST(s), dont 24 nouveaux. Le séquençage du gène *bla*_{OXA-51-like} a identifié 34 variants, dont 21 nouveaux.

Ce travail a permis de montrer que le Liban était un pays à forte endémie d'*A. baumannii* résistants aux carbapénèmes. Nous avons ainsi mis en évidence que les clones circulant dans l'environnement étaient globalement différents de ceux isolés lors d'infections chez l'homme. Cette étude montre qu'il n'y a pas de lien direct entre les souches cliniques et l'environnement extra-hospitalier mais qu'il existe une niche potentiellement animale qu'il conviendrait d'explorer par des études plus larges et détaillées.

mots-clés : *Acinetobacter baumannii*, Liban, épidémiologie hospitalière, épidémiologie extra-hospitalière, typage, résistance aux carbapénèmes, animaux

ABSTRACT

A. baumannii is a bacterium responsible for nosocomial infections. This work aims to study the molecular epidemiology of hospital-acquired strains and strains isolated outside the hospital setting in Lebanon.

We analyzed strains isolated in hospitals, 66 % were resistant to carbapenems and *bla*_{OXA-23-like} was the dominant. Typing by multi locus sequence typing (MLST) revealed the predominance of ST2. Seventeen other ST(s), including 6 new, were also identified. We conducted a more thorough epidemiological analysis of 42 strains of nosocomial origin. The results showed the presence of a single clone spread to Tripoli and Beirut. Extra hospital epidemiology was studied on samples collected in Northern Lebanon. 42 strains have been identified in the environment and in animals. Unlike clinical strains, the strains were susceptible to antibiotics. The results of MLST typing showed the presence of 36 ST(s), including 24 new ones. The sequencing of *bla*_{OXA-51-like} gene identified 34 variants, including 21 new ones.

This work has shown that Lebanon is a country with high endemicity of *A. baumannii* resistant to carbapenems. We have thus demonstrated that the clones circulating in the environments were generally different from those isolated during infections in humans. This study shows that there is no direct link between clinical strains and extra hospital environment but a potentially animal niche that should be explored by broader and detailed studies.

Keywords : *Acinetobacter baumannii*, Lebanon, hospital epidemiology, extra-hospital epidemiology, typing, carbapenem resistance, animals.

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussignée Rayane RAFEI
déclare être pleinement consciente 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.

signé le 25 / 07 / 2014



Dédicace

Je dédie ce travail

A

Ceux qui ont attendu avec patience les fruits de leur bonne éducation

Mon cher père Mahmoud Rafei et ma chère mère Atika Baytié

pour leurs encouragements, leur amour et leur support infini

Je les remercie de m'avoir accompagnée tout au long de mon parcours

Mes sœurs Chaymaa, Hiba et Malak et Mes frères Farouk et Oussama

Mes grands-pères et Mes grands-mères

Mes tantes et Mes oncles

Mes nièces adorées Barraa et Yara

Mon oncle Abed Allatif pour son aide précieuse durant cette thèse

Ce travail est le vôtre car je n'ai pu le réaliser qu'en pensant à l'amour que vous

me portez.

Remerciements

Je tiens à remercier très sincèrement:

Mes directeurs de thèse en France, Madame le Professeur Marie-Laure Joly-Guillou, et au Liban, Monsieur le Professeur Fouad Dabboussi, pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ma thèse au sein de leur équipe et m'avoir enseigné leur rigueur scientifique, pour leur aide, leur soutien et leurs suggestions. Travailler avec eux a vraiment été un honneur réel.

Mon encadrante, Madame le Docteur Marie Kempf, pour m'avoir encadrée durant ma thèse, pour ses encouragements, sa disponibilité, ses conseils, son écoute à mes questions illimitées et sa grande vitesse dans la correction du manuscrit de thèse.

Le directeur du laboratoire de Microbiologie, Santé et Environnement dans l'Université Libanaise, Monsieur le Professeur Monzer Hamze, pour sa disponibilité malgré les charges académiques et professionnelles, pour l'aide et le temps qu'il a bien voulu me consacrer.

Le directeur du Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, Monsieur le Professeur Jean Philippe Bouchara pour m'avoir accueillie dans son équipe.

Le directeur de Centre Azm pour la recherche en Biotechnologie et ses applications, Monsieur le Professeur Mohamad Khalil, pour sa bonne gestion du centre et son dynamisme.

La fondation sociale AZM et Saadé, d'avoir financé ma thèse durant mon séjour en France.

Madame le Professeur Jocelyne Caillon et Madame le Professeur Sima Tokajian pour m'avoir fait l'honneur de participer au Jury de soutenance, et je les remercie d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail.

Madame Patricia Gobé pour son assistance matérielle et morale durant ma thèse. Je la remercie profondément.

Toutes les personnes du service de bactériologie du Centre Hospitalo-Universitaire d'Angers, en particulier Madame le Docteur Carole Lemarié, Monsieur le Docteur Matthieu

Eveillard, les techniciens Catherine Quinqueneau, Marie-Pierre Gaultier, Catherine Ramont, Viviane Cassisa et Cyrielle Lebreton.

Toutes les personnes de Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène.

Toutes les personnes du laboratoire de Microbiologie, Santé et Environnement. Je cite les techniciens Taha Abdo, Mariam yehya, Farah Obeid charrouf, Husame Khaled et Imane Darwich.

Mes collègues Dima Safadi et Marwan Osman pour leur aide précieuse durant la collection des échantillons.

Enfin, je n'oublie pas de remercier ma chère amie Sarah Ghamrawi qui était une source de motivation réelle durant mon séjour en France.

Sommaire

SOMMAIRE	1
LISTE DES ABRÉVIATIONS	4
LISTE DES TABLEAUX	6
LISTE DES FIGURES	7
INTRODUCTION GENERALE	8
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	12
1. LE GENRE ACINETOBACTER	12
1.1. Aperçu historique.....	12
1.2. Taxonomie actuelle	12
2. CARACTERES BACTERIOLOGIQUES DE GENRE ACINETOBACTER.....	16
2.1. Caractéristiques morphologiques et métaboliques.....	16
2.2. Caractères cultureux	16
3. IDENTIFICATION DU GENRE ACINETOBACTER ET PLUS PRECISEMENT DU COMPLEXE A. CALCOACETICUS-A. BAUMANNII	18
3.1. Identification phénotypique	18
3.2. Identification moléculaire.....	19
3.2.1. Méthodes d'identification basées sur les fragments d'ADN après électrophorèse	20
A. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)	20
B. PCR-RFLP (Restriction fragment length polymorphism)	20
C. Ribotypage	20
D. tRNA spacer fingerprinting	21
3.2.2. Techniques de PCR ciblant un gène spécifique	21
A. PCR ciblant le gène bla _{OXA-51-like}	21
B. PCR ciblant le gène gyrB.....	22
C. PCR ciblant les gènes recA et ITS	22
3.2.3. Méthodes d'identification basées sur l'analyse des séquences d'ADN.....	23
A. Analyse des séquences de ADN ribosomal 16S (ADNr 16S)	23
B. Analyse des séquences ITS	23
C. Séquençage de gènes codant pour des protéines.....	24
4. EPIDEMIOLOGIE D'A. BAUMANNII	26
4.1. Epidémiologie hospitalière	26
4.2. Epidémiologie extra-hospitalière.....	27
5. RESERVOIR EXTRA-HOSPITALIER D'A. BAUMANNII	28
5.1. Portage d'A. baumannii chez l'Homme.....	29

5.2. <i>A. baumannii</i> et environnement	29
5.3. <i>A. baumannii</i> chez les animaux.....	30
6. RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES CHEZ <i>A. BAUMANNII</i>	31
6.1. <i>Résistance naturelle</i>	32
6.2. <i>Résistance acquise aux bêta-lactamines</i>	32
6.2.1. <i>Mécanismes enzymatiques</i>	34
6.2.1.1. La surproduction des β -lactamases intrinsèques	34
A. La céphalosporinase chromosomique (AmpC).....	34
B. L'oxacillinase chromosomique (OXA-51)	34
6.2.1.2. Acquisition des β -lactamases à spectre étroit ou à spectre étendu	35
6.2.1.3. Acquisition des β -lactamases conférant la résistance aux carbapénèmes, ou carbapénèmases	35
A. Les β -lactamases de classe A	36
B. Les β -lactamases de classe B	36
C. Les β -lactamases de classe D	37
OXA-23-like	37
OXA-24/40-like	38
OXA-58-like	38
OXA-143-like	38
OXA-235-like	39
6.2.2. <i>Mécanismes non enzymatiques</i>	39
6.3. <i>Résistance acquise aux aminosides</i>	40
6.4. <i>Résistance acquise aux quinolones</i>	41
6.5. <i>Résistance acquise à la colistine</i>	41
6.6. <i>Traitement des infections à A. baumannii</i>	42
7. PATHOGENICITE ET MECANISMES DE VIRULENCE	43
8. EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE D' <i>A. BAUMANNII</i>	46
9. REVUE SUR LES METHODES MOLECULAIRES ACTUELLES POUR LE TYPAGE EPIDEMIOLOGIQUE D' <i>A. BAUMANNII</i>	51
PARTIE EXPERIMENTALE	89
CHAPITRE UN-ARTICLE 1	90
<i>Introduction</i>	91
<i>Commentaires</i>	95
CHAPITRE DEUX-ARTICLE 2	96
<i>Introduction</i>	97
<i>Commentaires</i>	125
CHAPITRE TROIS-ARTICLE 3	128
<i>Introduction</i>	129
<i>Commentaires</i>	147
CHAPITRE QUATRE-ARTICLE 4	149
<i>Introduction</i>	150
<i>Commentaires</i>	187
DISCUSSION GENERALE	189

CONCLUSION..... 198
REFERENCES..... 200
ANNEXE A 229
ANNEXE B 231

Liste des abréviations

<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
AB-PBRT	<i>A. baumannii</i> - PCR based replicon typing
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFLP	Amplified fragment length polymorphism
ARDRA	Amplified ribosomal DNA restriction analysis
ARN	Acide ribonucléique
ATCC	American type culture collection (Etats-Unis)
BAP	Biofilms-associated protein
BJ	Bouvet et Jeanjean
<i>bla</i>	β -lactamase
<i>bla</i> _{OXA-51-like} SBT	<i>bla</i> _{OXA-51-like} sequence based typing
BLAST	Basic local alignment tool
BLSE	β -lactamases à spectre étendu
CC	Clonal complex
CHDL	Carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamases
CMI	Concentration minimale inhibitrice
DL	DiversiLab
ESI-MS	Electrospray-ionisation mass spectrometry
gen. sp	Genomospecies ou espèces génomiques
IS	Insertion sequence
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
LPS	Lipopolysaccharide
LUH	Collection of Leiden University Medical Center (Pays-Bas)
LUMC	Leiden University Medical Center
MALDI-TOF spectrometry	Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry
MDR	Multi-drug resistant
MLST	Multilocus sequence typing

MLVA	Multiple-locus variable number of tandem repeat analysis
MS	Mass spectrometry
NDM	New Delhi metallo- β -lactamase
NIPH	National Institute of public health (république de tchèque)
OMP	Outer membrane protein
OMV	Outer membrane vesicle
OXA	Oxacillinase
pb	Pair de base
PCR	Polymerase chain reaction
PFGE	Pulsed-field gel electrophoresis
PLP	Protéines de liaison des pénicillines
RAPD	Random amplified polymorphic DNA
rep-PCR	Repetitive extragenic palindromic-PCR
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SG	Sequence group
SIM	Seoul imipenemase
SLST	Single-locus sequence-based typing
SNP	Single nucleotide polymorphism
ST	Sequence type
tDNA	Transfer DNA
3-LST	3-locus sequence typing
Tn	Transposon
TU	Tjernberg et Ursing
VNTR	Variable number of tandem repeats
WGS	Whole genome sequencing

Liste des tableaux

Tableau 1 : Description des espèces appartenant au genre <i>Acinetobacter</i>	15
Tableau 2 : Méthodes génotypiques disponibles pour l'identification des espèces <i>Acinetobacter</i>	25
Tableau 3 : Récapitulatif des mécanismes de résistance rapportés chez <i>A. baumannii</i>	42
Tableau 4 : Facteurs de virulence identifiés chez <i>A. baumannii</i>	46
Tableau 5 : Répartition en complexes clonaux des souches multirésistantes d' <i>A. baumannii</i> , en fonction des méthodes moléculaires de typage.....	49

Liste des figures

Figure 1 : Problèmes présents dans la taxonomie actuelle de genre <i>Acinetobacter</i>	14
Figure 2 : Différence dans la taille des colonies de plusieurs espèces d' <i>Acinetobacter</i> isolées à partir d'échantillons cliniques.....	17
Figure 3 : Diagramme schématique présentant les positions d'hybridations, les spécificités des espèces et les tailles prévues des produits de PCR en utilisant les amorces de PCR multiplexe 1 et PCR multiplexe 2 de Higgins.....	22
Figure 4 : Représentation schématique montrant la variabilité du gène <i>rpoB</i> et les séquences adjacentes en fonction de position des nucléotides.....	25
Figure 5 : Contexte génétique de l'îlot de résistance de 86 Kb chez <i>A. baumannii</i> -souche AYE.....	32
Figure 6 : Mécanismes de résistance aux β -lactamines.....	33
Figure 7 : Cartes représentant la distribution géographique de la population d' <i>A. baumannii</i> basée sur les données de deux schémas de MLST analysées par Karah et ses collègues en 2012.....	48
Figure 8 : Migration électrophorétique en champ pulsé de 12 souches d' <i>A. baumannii</i> après digestion enzymatique.....	126
Figure 9 : Répartition en 4 groupes des séquence-types identifiés dans cette étude.....	197

Introduction générale

Acinetobacter baumannii est un coccobacille à Gram négatif non fermentant. Considéré en 1960, comme une bactérie de faible pathogénicité souvent ignorée dans les prélèvements cliniques, *A. baumannii* a évolué de façon impressionnante vis-à-vis de la résistance aux antibiotiques à travers le monde entier (Joly-Guillou, 2005). C'est le deuxième organisme non fermentant isolé lors d'infections nosocomiales chez l'homme après *Pseudomonas aeruginosa* (Doughari et al., 2011). Il est impliqué dans environ 9 % des infections dans les services de réanimation et a été rapporté dans près de 75 pays répartis sur les 5 continents (Vincent et al., 2009). Il est principalement responsable d'infections nosocomiales sévères à type de pneumopathies acquises sous ventilation, de bactériémies, d'infections urinaires ou encore de surinfections de plaies (Eveillard and Joly-Guillou, 2012). Il peut se manifester sous forme de véritables "bouffées épidémiques" avec des capacités d'épidémiogénicité similaires à celles des staphylocoques résistantes à la méticilline, ce qui a conduit certains auteurs à le qualifier de "Gram negative MRSA" (Joly-Guillou, 2005).

Parallèlement, *A. baumannii* a émergé comme agent impliqué dans des infections communautaires. Parmi celles-ci, les cas de pneumopathie ont été les plus rapportés. Ils interviennent sur des terrains préexistants d'intoxication alcoolique, de diabète, de cancer ou de bronchopneumopathie chronique obstructive (Eveillard and Joly-Guillou, 2012). Ces infections sont associées à un taux élevé de morbi/mortalité (Falagas et al., 2006). Cette bactérie fait l'objet d'une attention toute particulière de la part des militaires car une prévalence élevée des infections post-traumatiques a été observée chez les blessés durant les opérations militaires en Iraq et en Afghanistan ou encore chez les survivants des catastrophes naturelles (Eveillard and Joly-Guillou, 2012).

Afin de caractériser l'épidémiologie moléculaire de ce pathogène, identifier les dynamiques de transmission, surveiller les épidémies nosocomiales et implanter un schéma de contrôle le plus pertinent possible, différentes techniques de typage ont été proposées parmi lesquels les plus utilisées ont été l'électrophorèse en champ pulsé (pulsed field gel electrophoresis, PFGE), la repetitive extragenic palindromic-PCR (rep-PCR), ou encore la

multilocus sequence typing (MLST) (Diancourt et al., 2010; Higgins et al., 2010a; Seifert et al., 2005). Les études de typage moléculaire ont révélé la présence d'un petit nombre de clones responsable des épidémies nosocomiales. Parmi ces clones, les 3 clones internationaux I, II, III sont les plus communs (Diancourt et al., 2010).

En plus de sa capacité à disséminer dans les hôpitaux sous forme d'épidémie, *A. baumannii* présente une capacité étonnante à acquérir des mécanismes de résistance aux antibiotiques, conduisant rapidement à une multirésistance et parfois à des impasses thérapeutiques. La prise en charge des infections à *A. baumannii* est donc devenue un véritable problème de santé publique dans de nombreux pays. Plusieurs mécanismes sont impliqués dans l'apparition de cette multirésistance (Roca et al., 2012). Parmi ceux-ci, l'acquisition d'éléments génétiques mobiles comme les séquences d'insertions, les plasmides, les transposons, les intégrons et les îlots de résistance jouent un rôle important. Les carbapénèmes, bêta-lactamines à large spectre introduites en 1985, ont été considérés longtemps comme les antibiotiques de référence pour le traitement des infections à *A. baumannii*. Cependant, la résistance à ces agents a été observée mondialement (Evans et al., 2013) et des études ont montré que sa prévalence pouvait atteindre plus de 50 % dans certains pays (Sader et al., 2014). Le principal mécanisme de résistance aux carbapénèmes chez *A. baumannii* est la production de carbapénémases acquises de type oxacillinases (OXA) et codées par les gènes de type *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-58-like}. A moindre degré, les carbapénémases de classe B et A ont également été impliquées (Bonnin et al., 2013b; Kempf and Rolain, 2012; Roca et al., 2012).

Alors que l'écologie hospitalière d'*A. baumannii* est assez bien connue, son habitat primitif reste encore inconnu et peu étudié. Le développement des méthodes d'identification moléculaire a toutefois amélioré la compréhension de son écologie, sans pour autant révéler son habitat primitif. De nombreuses publications rapportent sa présence hors des hôpitaux (Choi et al., 2012; Eveillard et al., 2013; Hamouda et al., 2011; Kempf et al., 2012a, 2012b; Seifert et al., 1997; Zordan et al., 2011). La bactérie a ainsi été détectée chez l'homme sain, chez des animaux domestiques, ou encore chez des poux de corps ou de tête (Eveillard et al., 2013). De rares publications ont étudié les génotypes d'*A. baumannii* hors de l'environnement hospitalier et notamment chez les animaux. Certaines résultats ont ainsi montré que les clones isolés chez les animaux étaient identiques aux clones humains, (Zordan et al., 2011) alors que d'autres ont montré des résultats différents (Hamouda et al., 2011).

Objectif de la thèse

L'objectif principal de cette thèse a été de participer à la compréhension de l'écologie hospitalière et extra-hospitalière d'*A. baumannii*, en caractérisant des souches cliniques, environnementales et animales isolées au Liban.

Vue globale des différentes parties de la thèse

La première partie de la thèse est consacrée à la revue bibliographique d'*A. baumannii*. Dans ce chapitre, nous développons les outils utilisés en laboratoire pour l'identification de cette bactérie, l'épidémiologie hospitalière et extra-hospitalière, les réservoirs potentiels d'*A. baumannii*, les mécanismes de résistance aux antibiotiques et les principaux facteurs de virulence connus. Ce chapitre présente également les méthodes moléculaires de typage actuellement utilisées dans le monde scientifique et médical pour étudier l'épidémiologie de la bactérie. Ce dernier point a fait l'objet d'une publication sous forme de revue dans le journal "Future Microbiology" (revue acceptée).

La deuxième partie, divisée en plusieurs chapitres, est consacrée au travail expérimental :

Le **chapitre un** décrit la première détection de souches d'*A. baumannii* productrices de la carbapénémase NDM-1 isolées dans un hôpital au Liban. Ces souches ont été isolées chez des civils syriens blessés durant la guerre de Syrie et rapatriés au Liban. Cette étude a été publiée sous forme de « short communication » dans le journal "International Journal of Infectious Diseases" (Rafei et al., 2014).

L'objectif de l'étude suivante, développée dans le **chapitre deux**, a été de comparer la pertinence et l'efficacité de quatre méthodes de typage pour la caractérisation épidémiologique de 42 souches d'*A. baumannii* isolées de différents hôpitaux de Tripoli et Beyrouth. Ce travail a été soumis dans le journal "PLoS ONE" (soumis le 11 juin 2014, numéro de soumission PONE-D-14-21953).

Le **chapitre trois** décrit les caractéristiques épidémiologiques et les mécanismes moléculaires de résistance aux carbapénèmes d'un panel de souches 116 souches d'*A. baumannii* isolées de 6 hôpitaux publics de Tripoli-Liban.

Le **chapitre quatre** est consacré à l'étude de la présence d'*A. baumannii* dans le milieu extra-hospitalier (aliments, animaux). Ce travail est soumis dans le journal "Applied and Environmental Microbiology".

Dans le **chapitre cinq**, nous discuterons l'ensemble des résultats obtenus durant ces trois années de thèse.

Enfin, une conclusion générale sera présentée, suivie de perspectives de ce travail de recherche.

Etude bibliographique

1. Le genre *Acinetobacter*

1.1. Aperçu historique

L'histoire de genre *Acinetobacter* a été largement confuse durant de très nombreuses années (Bouvet and Joly-Guillou, 2000). Elle débute en 1911 avec la description d'un microbiologiste néerlandais (Martinus Willem Beijerinck) d'un microorganisme dénommé *Micrococcus calcoaceticus* isolé à partir des prélèvements de sol enrichis dans un milieu minimum contenant l'acétate et le calcium (Beijerinck, 1911). Dans les années suivantes, des bactéries similaires ont été décrites indépendamment par plusieurs auteurs et ont été classées dans au moins 15 genres différents (Peleg et al., 2008). C'est en 1954 que la désignation de genre *Acinetobacter* (du grec *akinetos* : « immobile ») a été proposée pour la première fois par Brisou et Prévot pour séparer les bactéries immobiles des bactéries mobiles du genre *Achromobacter* (Brisou and Prévot, 1954). Le genre *Acinetobacter* a regroupé une collection hétérogène de bactéries à Gram négatif, immobiles, à réaction d'oxydase positive ou négative (Doughari et al., 2011). En 1971, suite aux travaux de Baumann et de ses collègues (Baumann et al., 1968), le sous-comité pour la taxonomie des *Moraxella* et ses bactéries apparentées a déclaré officieusement que le genre *Acinetobacter* devait inclure uniquement les espèces à oxydase négative (Towner, 2006).

1.2. Taxonomie actuelle

Avant l'année 1986, la taxonomie des *Acinetobacter* était très simple. Ce genre a été considéré tantôt comme une seule espèce, *A. calcoaceticus*, et tantôt comme deux espèces: *A. calcoaceticus* pour les souches oxydant le glucose et *A. lwoffii* pour les souches n'oxydant pas le glucose (Bouvet and Joly-Guillou, 2000; Peleg et al., 2008; Seifert and Dijkshoorn, 2008). A l'heure actuelle, ce genre est formé de 50 espèces dont 34 portant des noms propres et officiels et 16 espèces portant ou bien des désignations provisoires (9) ou bien des noms publiés (7) (Tableau 1) (Euzéby, 2014; Nemeč, 2014). Cette avancée a commencé en 1986 avec les travaux de Bouvet et Grimont qui sont parvenus, grâce aux techniques d'hybridations

ADN-ADN, à distinguer 12 groupes d'hybridation d'ADN ou espèces génomiques (gen. sp.) dont les espèces 1, 2, 4, 5, 7, 8 seules ont dénommées respectivement *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. haemolyticus*, *A. Junii*, *A. Johnsonii* et *A. lwofii*. L'épithète *baumannii* correspond aux noms des bactériologistes Américains Paul et Linda Baumann (Bouvet and Grimont, 1986). Ultérieurement, des travaux indépendamment effectués ont abouti à une confusion dans la nomenclature des espèces (Figure 1). Tjernberg et Ursing (Tjernberg and Ursing, 1989) ont décrit 3 groupes d'ADN additionnels numérotés de 13-15. Parallèlement, Bouvet et Jeanjean (Bouvet and Jeanjean, 1989) ont décrit 5 espèces génomiques protéolytiques numérotées de 13-17. Pour éviter toute confusion, la pratique courante consiste à ajouter à ces numéros un suffixe avec les initiales des auteurs (TU pour Tjernberg et Ursing ; BJ pour Bouvet and Jeanjean) (Seifert and Dijkshoorn, 2008). Par ailleurs, certaines espèces se sont révélées être 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 Nemeč, 2008; Seifert and Dijkshoorn, 2008) ainsi que *A. ursingii* et *A. septicus* (Nemeč et al., 2008). Récemment, plusieurs espèces génomiques de Bouvet et Grimont ont été nommées: *A. gen. sp 3* est devenu *A. pittii*, *A. gen. sp 13TU* est devenu *A. nosocomialis*, *A. gen sp 10* est devenu *A. bereziniae*, et *A. gen. sp 11* est devenu *A. guillouiae* (Nemeč et al., 2011, 2010).

Un autre problème qui a abouti à l'extension rapide de ce genre bactérien est la description de nouvelles espèces à partir d'une ou plusieurs souches (Dijkshoorn and Nemeč, 2008; Seifert and Dijkshoorn, 2008). Les différentes espèces du genre *Acinetobacter* sont décrites dans le Tableau 1.

Un autre défi affectant la taxonomie de ce genre bactérien est la présence de "complexes" formés d'espèces génotypiquement très proches (Seifert and Dijkshoorn, 2008). Le complexe le plus connu est celui d'"*Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii*" qui comprend 4 espèces *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. nosocomialis* et *A. pittii*. *A. calcoaceticus* est une espèce environnementale rarement isolée des prélèvements cliniques, alors que les 3 autres espèces, *A. baumannii*, *A. pittii* et *A. nosocomialis* partagent des caractéristiques épidémiologiques et cliniques importantes. Peleg *et al.*, ont proposé l'utilisation du terme 'groupe *A. baumannii*' pour rassembler ces 3 espèces au lieu 'du complexe *A. calcoaceticus*-*A. baumannii*' (Peleg et al., 2008).

Ce genre est actuellement défini dans la famille des *Moraxellaceae* avec les lignées taxonomiques suivantes (domaine des *Bacteria*, phylum des *Proteobacteriae*, classe des

Gammaproteobacteria, ordre des *Pseudomonadales*, famille des *Moraxellaceae*, genre *Acinetobacter*). Le contenu de l'ADN en guanine et cytosine est situé entre 39-47%. (Doughari et al., 2011).

- 9 espèces génomiques ne portent pas un nom propre
- Certaines espèces se sont révélées être synonymes :
 - ✓ Genome species 13 sensu Bouvet et Jeanjean (BJ) et genome species 14 sensu Tjernberg et Ursing (TU)
 - ✓ *A. Iwoffii* et genome species 9
 - ✓ *A. junii* et *A. grimontii*
 - ✓ *A. ursingii* et *A. septicus*
- Certaines espèces génomiques différentes ont des désignations similaires.
 - ✓ Genome species 14 BJ et genome species 14TU
 - ✓ Genome species 15 BJ et genome species 15TU
- Certaines espèces génomiques et la plupart des espèces ne portant pas de nom comprennent seulement une ou quelques souches
- L'identification de la plupart des espèces est une problématique

Figure 1 : Problèmes présents dans la taxonomie actuelle de genre *Acinetobacter* (Dijkshoorn and Nemeč, 2008; Euzéby, 2014; Nemeč et al., 2008; Seifert and Dijkshoorn, 2008).

Tableau 1 : Description des espèces appartenant au genre *Acinetobacter* (Euzéby, 2014; Nemec, 2014).

Espèce du genre <i>Acinetobacter</i>	Principale origine d'isolement
<i>Espèces portant des noms propres bien validés</i>	
<i>A. baumannii</i>	Homme, animaux
<i>A. baylyi</i>	Sol
<i>A. beijerinckii</i>	Homme, animaux, sol, eau
<i>A. bereziniae</i> (anciennement groupe ADN 10)	Homme
<i>A. boissieri</i>	Nectar floral
<i>A. bouvetii</i>	Boue activée
<i>A. brisouii</i>	Tourbe
<i>A. calcoaceticus</i>	Sol
<i>A. gernerii</i>	Boue activée
<i>A. grimontii</i> (= <i>A. junii</i>)	Boue activée
<i>A. guillouiae</i> (anciennement groupe ADN 11)	Homme, sol
<i>A. gyllenbergii</i>	Homme
<i>A. haemolyticus</i>	Homme
<i>A. harbinensis</i>	Eau de rivière
<i>A. indicus</i>	Dumpsite
<i>A. johnsonii</i>	Homme, animaux
<i>A. junii</i>	Homme
<i>A. kookii</i>	Sol
<i>A. lwoffii</i>	Homme, animaux
<i>A. nectaris</i>	Nectar floral
<i>A. nosocomialis</i> (anciennement groupe ADN 13TU)	Homme
<i>A. parvus</i>	Homme, animaux
<i>A. pittii</i> (anciennement groupe ADN 3)	Homme, sol
<i>A. puyangensis</i>	Ecorce de Populus
<i>A. qingfengensis</i>	Ecorce de Populus
<i>A. radioresistens</i>	Homme, sol, cotton
<i>A. rudis</i>	Lait cru, eaux usées
<i>A. schindleri</i>	Homme
<i>A. soli</i>	Sol, homme
<i>A. tandoii</i>	Boue activée
<i>A. tjernbergiae</i>	Boue activée
<i>A. townneri</i>	Boue activée
<i>A. ursingii</i>	Homme
<i>A. venetianus</i>	Eau de mer
<i>Espèces portant des dénominations provisoires ou publiées</i>	
DNA group 6*	Homme
DNA group 13BJ/14TU*	Homme
DNA group 14BJ*	Homme
DNA group 15BJ*	Homme
DNA group 15TU*	Homme,
DNA group 16*	Homme, végétaux
DNA group 17*	Homme, sol
DNA group Between 1 and 3*	Homme
DNA group Close to 13TU*	Homme
" <i>A. antiviralis</i> "	Mer
" <i>A. kyonggiensis</i> "	Egouts
" <i>A. marinus</i> "	Mer
" <i>A. oleivorans</i> "	Riz
" <i>A. oryzae</i> "	Riz
" <i>A. seohaensis</i> "	Mer
" <i>A.septicus</i> "= <i>A. ursingii</i>	Homme

*: un groupe d'ADN ou une espèce génomique ne portant pas une dénomination précise

": espèces publiées mais leur description complète n'est pas encore effectuée.

2. Caractères bactériologiques de genre *Acinetobacter*

2.1. Caractéristiques morphologiques et métaboliques

Les *Acinetobacter* sont des bacilles ou coccobacilles à coloration de Gram négative souvent groupés en paires, immobiles, asporulés, parfois capsulés. Ils résistent parfois à la décoloration de Gram et peuvent donc être mal identifiés, soit comme de *cocci* à Gram négatif, soit comme des *cocci* à Gram positif (Bouvet and Joly-Guillou, 2000). En phase exponentielle, les bacilles ont une diamètre typique entre 0,9-1,6 sur 1,5-2,5 µm de longueur, mais deviennent plus coccoïdes dans la phase stationnaire (Bergogne-Berezin and Towner, 1996; Towner, 2006). Ce sont des bactéries non fermentaires, incapables de métaboliser les carbohydrates par les voies fermentaires (Vanechoutte et al., 2011).

Bien qu'elles soient immobiles, non flagellées, certaines souches peuvent présenter un mouvement de tremblement ou une "twitching mobility" qui est un phénomène particulièrement retrouvé sur des milieux semi solides (Roca et al., 2012). Les bactéries sont aérobies strictes et présentent des réactions de catalase positive et d'oxydase négative. Le test d'oxydase sert comme un outil d'identification rapide pour distinguer les *Acinetobacter* des autres bactéries similaires non fermentaires (Vanechoutte et al., 2011). Plusieurs souches sont incapables de réduire le nitrate en nitrite. Par ailleurs, la majorité de tests biochimiques utilisés habituellement en bactériologie clinique sont négatifs : décarboxylase pour la lysine, l'ornithine, thiosulfate réductase (H₂S), tryptophanase (indole), DNase, beta-galactosidase (Bouvet and Joly-Guillou, 2000).

2.2. Caractères cultureux

Les *Acinetobacter* sont des bactéries prototrophes, non exigeantes, facilement cultivées sur les milieux gélosés courants (gélose trypto-caséine soja ou gélose infusion cœur-cervelle) (Bouvet and Joly-Guillou, 2000). La plupart des espèces se développent à des températures d'incubation de 20-37°C avec un optimum de croissance entre 33-35°C (Seifert and Dijkshoorn, 2008). La température 37°C permet la bonne croissance des isolats cliniques des *Acinetobacter*, et certaines souches poussent à 42°C (Towner, 2006). *A. baumannii* et *A. nosocomialis* sont les seules espèces à cultiver à 44°C (Bouvet and Joly-Guillou, 2000). Ces organismes forment des colonies blanches grisâtres, lisses, parfois muqueuses. Les colonies de complexe *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* sont similaires à celles des entérobactéries avec une diamètre de 1,5 à 3 mm après une culture de 18-24 heures, alors que la plupart des autres

espèces du genre *Acinetobacter* forment des colonies plus petites et plus transparentes (Peleg et al., 2008; Seifert and Dijkshoorn, 2008) (Figure 2). Le caractère hémolytique peut être trouvé chez quelques espèces, mais jamais rapporté au sein de complexe *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* (Peleg et al., 2008; Seifert and Dijkshoorn, 2008).

Des milieux différentiels comme la gélose MacConkey peuvent distinguer les colonies d'*Acinetobacter* (Bouvet and Joly-Guillou, 2000). Cependant, contrairement aux entérobactéries, certaines espèces en dehors de complexe *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* sont incapables de pousser sur ce type de gélose (Peleg et al., 2008; Seifert and Dijkshoorn, 2008). Des milieux sélectifs ont été décrits, comme le milieu de Leeds *Acinetobacter* medium (Hardy Diagnostics, Etats-Unis, référence G261,) et récemment le milieu de CHROMagar (Chromagar; France, référence AC092) (Ajao et al., 2011; Jawad et al., 1994). Pour le dépistage environnemental, où la prévalence des *Acinetobacter* peut être très faible, l'enrichissement est utile (Bergogne-Berezin and Towner, 1996). Baumann (Baumann, 1968) a décrit un milieu minimum d'enrichissement d'*Acinetobacter* où l'acétate et le nitrate sont les seules sources de carbone et d'azote. Les souches *Acinetobacter* ont un pH optimum légèrement acide pour leur croissance. Une agitation intense à un pH de 5,5-6 et à une température de 30°C favorisent leur enrichissement (Bouvet and Joly-Guillou, 2000; Towner, 2006).

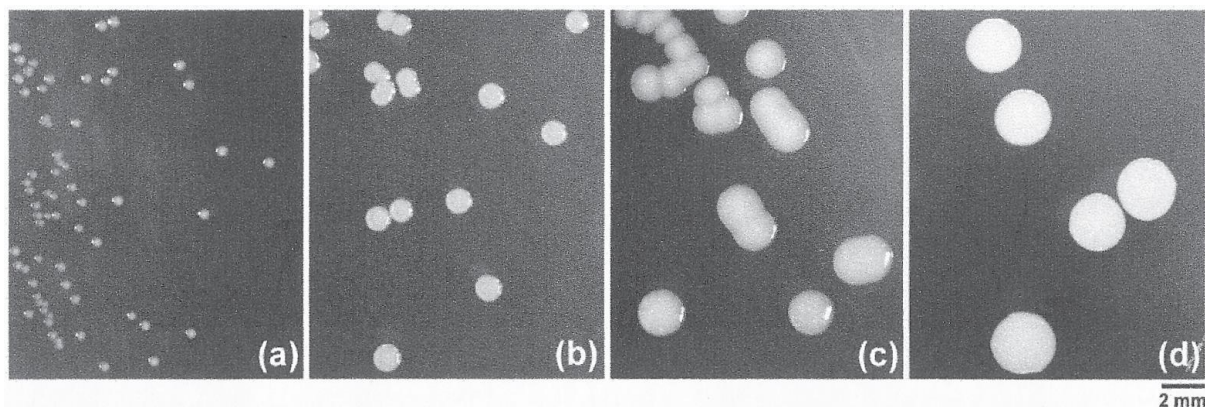


Figure 2 : Différence dans la taille des colonies de plusieurs espèces d'*Acinetobacter* isolées à partir d'échantillons cliniques. Ces souches ont été cultivées sur gélose trypticase de soja à 30°C pour 24 h. (a) *A. parvus* NIPH 384^T; (b) *A. ursingii* LUH 3792^T; (c) *A. schindleri* LUH 5832^T; (d) *A. baumannii* ATCC 19606^T (Vaneechoutte et al., 2011).

3. Identification du genre *Acinetobacter* et plus précisément du complexe *A. calcoaceticus*-*A. baumannii*

3.1. Identification phénotypique

Les espèces appartenant au genre *Acinetobacter* présentent une grande diversité de caractères nutritionnels et physiologiques. Bouvet et Grimont (Bouvet and Grimont, 1986) ont proposé un schéma de 28 tests phénotypiques capables d'identifier 11 espèces parmi les 12 premières espèces décrites dans leur étude. Ce schéma a été simplifié par les mêmes auteurs en 1987 (Bouvet and Grimont, 1987). Les tests phénotypiques proposés sont les suivants: la croissance à la température 37°C, 41°C, 44°C, l'oxydation du glucose, l'hydrolyse de gélatine et l'assimilation de 14 sources différentes de carbone. Ce dernier système a été considéré comme la méthode phénotypique de référence pour le diagnostic d'espèce (Seifert and Dijkshoorn, 2008). Cependant, Gener-Smidt *et al.*, (Gerner-Smidt et al., 1991) ont testé sa performance sur une collection des souches bien caractérisées par les techniques d'hybridation ADN-ADN. Seules 78 % des souches étaient correctement identifiées, avec des problèmes notés dans la séparation des 4 espèces du complexe *A. calcoaceticus*-*A. baumannii*. Malgré la très grande similarité phénotypique observée entre les souches appartenant au complexe *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* (Bouvet and Grimont, 1986; Gerner-Smidt et al., 1991), Nemeč et ses collègues (Nemeč et al., 2011) ont remarqué un certain degré de différenciation en se basant sur les caractères de température d'incubation et sur l'assimilation de malonate, L-tartrate, levulinate or citraconate.

Jusqu'à récemment, dans la plupart des laboratoires de microbiologie clinique, l'identification des *Acinetobacter* était réalisée à l'aide des galeries biochimiques commercialisées comme API 20NE et VITEK 2 (bioMérieux, France), ou PHOENIX (Becton Dickinson, Etats-Unis). Aucun de ces systèmes n'apparaît bon pour l'identification, en particulier parce qu'ils ne permettant pas de distinguer les espèces du complexe *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* (Bergogne-Berezin and Towner, 1996; Dijkshoorn and Nemeč, 2008; Peleg et al., 2008; Seifert and Dijkshoorn, 2008). Une étude menée en 2009 (Boo et al., 2009) a noté une mauvaise identification de 75 % des isolats en utilisant le système d'identification VITEK 2 GNI.

Dans l'histoire, d'autres schémas phénotypiques ont été proposés pour l'identification des *Acinetobacter*, comme la méthode basée sur la comparaison des profils des protéines de

l'enveloppe cellulaire après électrophorèse en SDS-PAGE (Dijkshoorn et al., 1990). Néanmoins, ces méthodes ne sont plus utilisées à ce jour. Récemment, la spectrométrie de masse Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF), une nouvelle technologie protéomique, a été mise sur le marché. Cette technique semble être une technique très prometteuse pour l'identification rapide des bactéries dans les laboratoires de microbiologie clinique (Patel, 2013). Trois instruments commerciaux sont actuellement disponibles: le MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Germany), le Vitek MS (bioMérieux, France) et l'Andromas (Andromas SAS, France).

Malgré la grande similarité phénotypique (déjà rapportée) entre le complexe *A. calcoaceticus*-*A. baumannii*, MALDI Biotyper a montré un potentiel dans la différenciation des espèces au sein de ce complexe. Néanmoins, des problèmes ont été rencontrés surtout dans la différenciation d'*A. nosocomialis* d'*A. baumannii* (Alvarez-Buylla et al., 2012). Plusieurs études ont essayé de résoudre ces problèmes soit par l'inclusion des spectres d'*A. nosocomialis* dans la base de donnée, soit par l'optimisation du protocole de MALDI-TOF (Espinal et al., 2012; Kishii et al., 2013; Šedo et al., 2013; Sousa et al., 2014a). Pour le Vitek MS, il n'y a actuellement pas d'étude publiée recherchant sa capacité discriminatoire au sein de ce complexe, et l'identification en routine est rapportée comme le complexe *A. baumannii* (Manji et al., 2014). Enfin, une autre technique de spectrométrie de masse, la spectroscopie infrarouge de Fourier, est capable de distinguer les espèces de ce complexe (Sousa et al., 2014b).

3.2. Identification moléculaire

Les techniques d'hybridation ADN-ADN représentent la méthode de référence actuelle pour la délimitation des espèces. Néanmoins, c'est une méthode contraignante et disponible seulement dans des laboratoires de référence spécialisés (Dijkshoorn and Nemeč, 2008). Ainsi, des méthodes moléculaires ont été développées pour l'identification rapide au rang de l'espèce chez *Acinetobacter* (Tableau 2). Il y a principalement 3 catégories majeures de méthodes qui sont i) les méthodes moléculaires basées sur la comparaison des fragments d'ADN séparés par électrophorèse; ii) les méthodes moléculaires basées sur l'amplification de gènes spécifiques d'espèce et iii) les méthodes moléculaires basées sur l'analyse des séquences d'ADN après séquençage.

3.2.1. Méthodes d'identification basées sur les fragments d'ADN après électrophorèse

A. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

Cette technique consiste à digérer l'ADN par 2 enzymes de restriction, puis à réaliser une ligation d'adaptateurs aux fragments de restriction. Après une amplification sélective des fragments à l'aide d'amorces spécifiques, les amplicons sont séparés sur un gel de séquence (Blears et al., 1998). L'AFLP et l'ARDRA (discuté après) sont considérées comme les méthodes les plus validées pour l'identification des *Acinetobacter*. Plusieurs protocoles ont été proposés pour délimiter les espèces de ce genre (Janssen et al., 1997; Koeleman et al., 1998; Seifert and Dijkshoorn, 2008). Le protocole du Centre Médical Universitaire de Leiden (Pays-Bas) est celui le plus utilisé (voir la partie de typage pour plus de détails) avec les seuils 50 %, 80 %, 90 % pour la délimitation des espèces (incluant les espèces de complexe *A. calcoaceticus*-*A. baumannii*), des clones et des souches respectivement (Van Belkum et al., 2007).

B. PCR-RFLP (Restriction fragment length polymorphism)

Cette technique utilise une amplification d'un locus spécifique suivie d'une restriction enzymatique (Li et al., 2009). Plusieurs *loci* ont été évalués pour leur potentiel discriminatoire au sein de genre *Acinetobacter*, comme le gène *ADNr* 16S (connu par Amplified ribosomal DNA restriction analysis, ARDRA), *recA*, et l'espaceur intergénique *ADNr* 16S-23S (Dolzani et al., 1995; Krawczyk et al., 2002; Nemeč et al., 2011; Vaneechoutte et al., 1995). Toutes ces méthodes peuvent différencier les espèces du complexe *A. calcoaceticus*-*A. baumannii*. Cependant, l'ARDRA est la technique la plus intéressante, avec la disponibilité d'une base de donnée pour comparer les profils générés par la restriction de l'*ADNr* 16S par 5 enzymes (*CfoI*, *AluI*, *MboI*, *RsaI* et *MspI*) (Dijkshoorn and Nemeč, 2008; Seifert and Dijkshoorn, 2008).

C. Ribotypage

Le ribotypage est un variant de la RFLP qui détecte le polymorphisme génétique présent au sein des gènes codant pour les ARNr ribosomaux et leur séquences d'ADN voisines (Severino and Brisse, 2005). Les ribotypes générés par les 3 enzymes de restriction *EcoRI*, *ClaI* ou *SalI* semblent très utiles pour distinguer les 4 espèces apparentées du complexe *A.*

calcoeticus-*A. baumannii* (Gerner-Smidt, 1992). Par ailleurs, les ribotypes générés avec *EcoRI* ou avec *HindIII* et/ou *HincII* en association avec d'autres méthodes comme l'AFLP permettent l'identification des clones épidémiques circulants en Europe (Dijkshoorn et al., 1996; Nemeč et al., 2004a). Cette technique a été automatisée et commercialisée sous le nom de Riboprinter™ (Dupont Qualicon, Etats-Unis). Une bonne corrélation a été trouvée entre Riboprinter™, ARDRA et AFLP pour l'identification des *Acinetobacter* (Van Dessel et al., 2004).

D. tRNA spacer fingerprinting

Le tDNA fingerprinting recherche le polymorphisme entre les gènes *ARNt* répartis en plusieurs copies dans le génome bactérien (Seifert and Dijkshoorn, 2008). Bien que cette technique semble convenable pour l'identification d'*Acinetobacter*, les espèces appartenant au complexe *A. calcoeticus*-*A. baumannii* sont mal différenciées et sont groupées en deux clusters (*A. calcoeticus*, *A. pittii*, *A. "between 1 and 3"* dans un cluster et *A. baumannii*, *A. nosocomialis* et *A. "close to 13TU"* dans un cluster) (Ehrenstein et al., 1996).

3.2.2. Techniques de PCR ciblant un gène spécifique

Pour faciliter et accélérer le diagnostic au rang de l'espèce, des nouvelles approches reposant sur la détection de gènes spécifiques, après amplification, ont été proposées comme des alternatives des méthodes de séquençage, et des méthodes basées sur la comparaison des profils des bandes d'ADN généralement indisponibles dans la plupart des laboratoires.

A. PCR ciblant le gène *bla*_{OXA-51-like}

Ce gène code pour une enzyme spécifique qui est l'oxacillinase, et est intrinsèque chez *A. baumannii* et trouvé naturellement sur le chromosome de cette espèce (Evans and Amyes, 2014), ce qui lui confère un excellent marqueur pour l'identification spécifique d'*A. baumannii* (Turton et al., 2006b). La détection de ce gène est largement appliquée pour le diagnostic d'*A. baumannii*. Toutefois, des études ont rapporté la présence de ce gène chez d'autres espèces d'*Acinetobacter* et de plus, il a été observé la présence de séquences d'insertions au sein de ce gène chez certaines souches (Chen et al., 2010; Lee et al., 2012, 2009; Zander et al., 2013b). Enfin, la détection d'autres oxacillinases intrinsèques comme *bla*_{OXA-134}, *bla*_{OXA-211}, *bla*_{OXA-213}, *bla*_{OXA-214}, *bla*_{OXA-228} a été suggérée comme un outil pour

l'identification des espèces *A. lwoffii*/*A. schindleri*, *A. johnsonii*, *A. calcoaceticus*, *A. haemolyticus*, *A. bereziniae* respectivement (Kamolvit et al., 2014).

B. PCR ciblant le gène *gyrB*

Higgins et ses collaborateurs (Higgins et al., 2007) ont proposé en 2007 une PCR multiplexe avec 3 amorces (Sp2F, Sp4R, Sp4F) ; afin de différencier *A. baumannii* et *A. nosocomialis*. Par cette technique, les deux espèces produisent un amplicon de 294 pb mais seul *A. baumannii* produit un amplicon supplémentaire de 490 pb (Figure 3). En 2010, une autre PCR multiplexe a été étendue par les mêmes auteurs pour différencier les deux autres espèces (*A. pittii* et *A. calcoaceticus*) du complexe *A. calcoaceticus*-*A. baumannii*. Cette deuxième PCR est formée de 2 paires d'amorces où la paire d'amorce (D16 et D8) produit un amplicon de 194 pb identifiant *A. pittii* et l'autre couple (D14 et D19), un amplicon de 428 pb identifiant *A. calcoaceticus* (Higgins et al., 2010b) (Figure 3). Cette approche s'est révélée être très intéressante pour distinguer les espèces de complexe *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* en générant des résultats très concordant avec les méthode de séquençage (Lee et al., 2014).

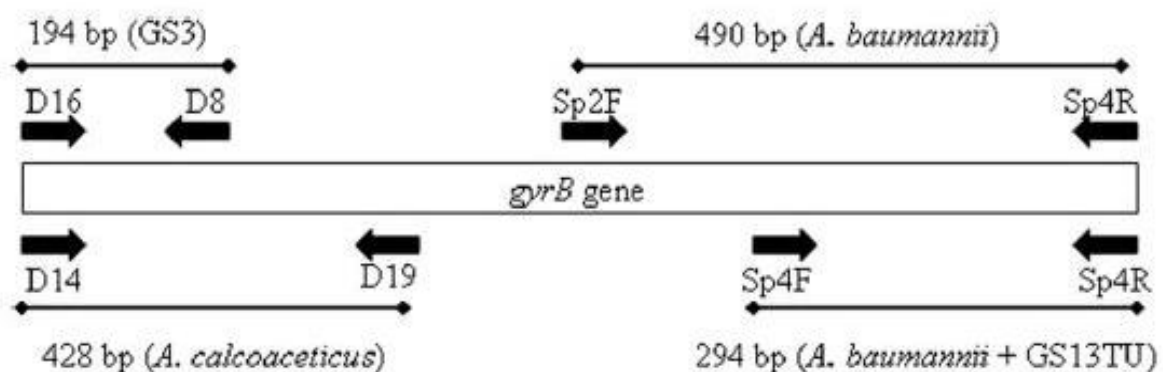


Figure 3 : Diagramme schématique présentant les positions d'hybridations, les spécificités des espèces et les tailles prévues des produits de PCR en utilisant les amorces de PCR multiplexe 1 (Higgins et al., 2007) et PCR multiplexe 2 (Higgins et al., 2010b).

C. PCR ciblant les gènes *recA* et ITS

Il s'agit d'une seule PCR multiplexe utilisant deux paires d'amorces : une paire amplifiant une région de 425 pb du gène de la *recombinase A* (*recA*) et servant comme un contrôle interne de PCR, et l'autre paire amplifiant un fragment de 208 pb de la région de l'espace intergénique de ADN_r16S-23S (ITS ou 16S-23S rRNA intergenic spacer) spécifique d'*A.*

baumannii (Chen et al., 2007). Cette stratégie permet le diagnostic d'*A. baumannii* (deux bandes) et des autres espèces du genre *Acinetobacter* (une bande) (Chen et al., 2007; Chiang et al., 2011).

3.2.3. Méthodes d'identification basées sur l'analyse des séquences d'ADN

A. Analyse des séquences de ADN ribosomal 16S (ADNr 16S)

Le gène *ARNr* 16S est le gène le plus utilisé pour étudier la taxonomie et la phylogénie des bactéries (Janda and Abbott, 2007). L'utilité de ce gène chez *Acinetobacter* est un sujet de débat (Dijkshoorn and Nemec, 2008; Ibrahim et al., 1997; Lee et al., 2014; Nemec et al., 2011; Seifert and Dijkshoorn, 2008; Vaneechoutte and De Baere, 2008). Il est clair que les données d'hybridation d'ADN-ADN et l'arbre phylogénique basé sur le gène *ARNr* 16S ne sont pas tout à fait identiques (Nemec et al., 2011; Seifert and Dijkshoorn, 2008). Par exemple, malgré la grande similarité du complexe *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* révélée par les techniques d'hybridation d'ADN et les autres gènes comme *rpoB*, *gyrB* et *recA*, les espèces de ce complexe sont situées sur différentes branches, et plus précisément, toutes les espèces de ce complexe sont situées dans un clade bien soutenu à l'exception d'*A. baumannii* (Nemec et al., 2011). Par ailleurs, Dijkshoorn et Nemec ont montré dans leur étude que les valeurs de similarité des séquences d'*ADNr* 16S entre 31 souches types et de référence de genre *Acinetobacter* étaient comprises entre 94,1 % et 99,6 % avec 3,7 % des valeurs à/ou au-dessus du seuil taxonomique de 98,7 % (Dijkshoorn and Nemec, 2008). Vaneechoutte et De Baere ont proposé, après une étude bien détaillée sur le rôle taxonomique de gène *ARNr* 16S, des nouveaux seuils pour l'identification des espèces de ce genre: sur une longueur de 1300 pb, une valeur de similarité de 99,7 % ou plus peut définir l'identité de l'espèce, par contre une valeur au-dessous de 99,6 % peut indiquer que ces deux souches appartenant à différentes espèces (Vaneechoutte and De Baere, 2008).

B. Analyse des séquences ITS

Le séquençage de l'espace intergénique ITS des gènes *ARNr* 16S-23S s'est révélé être très utile pour identifier les espèces du complexe *A. calcoaceticus*-*A. baumannii*. La similarité intra-espèces des séquences ITS au sein de ce complexe est située entre 0,99 à 1,0, alors que la similarité inter-espèces varie entre 0,86 et 0,92 (Chang et al., 2005). Le polymorphisme de cette séquence a donné l'idée à certains auteurs de designer des sondes et des puces pour

l'identification des espèces du complexe *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* (Ko et al., 2008; Lagatolla et al., 1998).

C. Séquençage de gènes codant pour des protéines

L'analyse des gènes encodant pour des protéines comme *recA* (*recombinase A*), *gyrB* (DNA gyrase β subunit) et *rpoB* (RNA polymérase β -subunit) révèle une plus grande capacité discriminatoire pour distinguer les espèces d'*Acinetobacter* que celle présente dans le gène *ARNr* 16S (Krawczyk et al., 2002; La Scola et al., 2006; Lee et al., 2014; Yamamoto et al., 1999). Par ailleurs, dans une étude pilote effectuée sur 267 isolats, une technique de spectrométrie de masse connue par PCR/ESI-MS (PCR/electrospray ionization mass spectrometry) a été évaluée pour sa capacité à identifier *A. baumannii* ainsi que d'autres espèces du genre *Acinetobacter* et à déterminer la clonalité (voir la revue plus de détail) (Ecker et al., 2006). Elle consistait à séquencer par spectrométrie les régions de 6 gènes de ménage (*trpE*, *adk*, *efp*, *mutY*, *fumC*, et *ppa*). Parmi ces gènes, *efp* (translation elongation factor P) était le seul capable d'identifier 18 espèces dont *A. baumannii*, *A. pittii*, et *A. nosocomialis*, alors que les autres gènes étaient capables de détecter 47 parmi 48 génotypes d'*A. baumannii* identifiés par séquençage.

Le gène *rpoB* présente un futur gène candidat pour les études taxonomiques, phylogénétiques et les identifications des espèces, spécialement les espèces très apparentées (Adékambi et al., 2009). La Scola *et al.*, (La Scola et al., 2006) ont montré la présence de deux zones très polymorphiques au sein du gène *rpoB* (tailles 350 et 450 pb) et deux zones variables adjacentes à l'extrémité du gène, les zones *rplL-rpoB* (301-310 pb) et *rpoB-rpoC* (86-177 pb) (Figure 4). Toutes ces 4 zones sont utiles pour l'identification des espèces d'*Acinetobacter*. Les auteurs ont proposé de séquencer la zone 1 (2090-3250) comme un schéma rapide pour l'identification des *Acinetobacter* en routine, et connu sous le nom de 'séquençage partiel du gène *rpoB*'. Cette zone a récemment été validée pour l'identification des *Acinetobacter* dont le complexe *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* (Gundi et al., 2009). La similarité inter-espèces des séquences de zone 1 de *rpoB* au sein de ce complexe est située entre 88,3 % et 96,9 % (Gundi et al., 2009). L'utilité de cette zone a été prouvée par des autres études ultérieures (Karah et al., 2011b; Lee et al., 2014) .

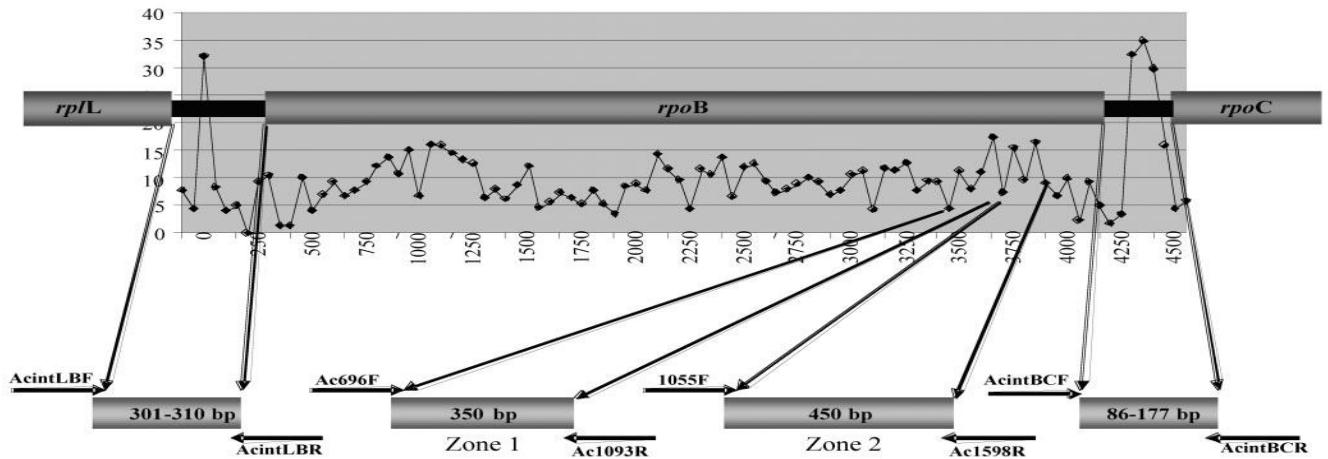


Figure 4 : Représentation schématique montrant la variabilité du gène *rpoB* et les séquences adjacentes en fonction de position des nucléotides. L'abscisse X indique les positions des nucléotides, l'abscisse Y indique le pourcentage de variabilités de 50 nucléotides. Les amorces amplifiant les espaceurs *rplL-rpoB* et *rpoB-rpoC* et les séquences partielles de gène *rpoB* sont encore schématisées sous forme de flèches (La Scola et al., 2006).

Tableau 2 : Méthodes génotypiques disponibles pour l'identification des espèces *Acinetobacter*.

Méthodes	Structure cible	Références
Hybridation ADN-ADN	Génome entier	(Bouvet and Grimont, 1986)
AFLP	Génome entier	(Janssen et al., 1997; Koeleman et al., 1998; Seifert and Dijkshoorn, 2008)
PCR-RFLP	<i>ADNr</i> 16S (ARDRA)	(Vanechoutte et al., 1995)
	<i>recA</i>	(Krawczyk et al., 2002)
	ITS	(Dolzani et al., 1995)
Ribotypage	<i>ADNr</i> et les régions adjacentes	(Gerner-Smidt, 1992)
tRNA spacer fingerprinting	Les espaceurs <i>ARNt</i>	(Ehrenstein et al., 1996)
Hybridation avec des sondes oligonucléotidiques	ITS	(Ko et al., 2008; Lagatolla et al., 1998)
PCR	gènes intrinsèques (<i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{OXA-134} , <i>bla</i> _{OXA-211} , <i>bla</i> _{OXA-213} , <i>bla</i> _{OXA-214} , <i>bla</i> _{OXA-228})	(Kamolvit et al., 2014; Turton et al., 2006b)
	<i>gyrB</i>	(Higgins et al., 2010b, 2007)
	<i>recA</i> et ITS	(Chen et al., 2007)

Analyse des séquences d'ADN	<i>ADNr 16S</i>	(Ibrahim et al., 1997)
	ITS	(Chang et al., 2005)
	<i>gyrB</i>	(Yamamoto et al., 1999)
	<i>recA</i>	(Krawczyk et al., 2002)
	<i>rpoB</i>	(La Scola et al., 2006)
	<i>efp</i>	(Ecker et al., 2006)

4. Epidémiologie d'*A. baumannii*

Au sein du genre *Acinetobacter*, l'espèce *baumannii* est la plus fréquemment associée aux infections. Toutefois, des études récentes rapportent un rôle non négligeable des espèces *A. pittii* et d'*A. nosocomialis* dans les infections (Karah et al., 2011b; Kishii et al., 2013).

4.1. Epidémiologie hospitalière

La fréquence des infections nosocomiales à *A. baumannii* n'a cessé d'augmenter au cours des dix dernières années (Joly-Guillou, 2005). Ces infections sont essentiellement présentes en unités de soins intensifs où elles représentent environ 10 % des infections nosocomiales alors qu'elles n'en représentent que 1 % dans les infections hospitalières tous services confondus [Enquête nationale de prévalence Française de 2006]. Aux Etats-Unis, les données du National Nosocomial Infection Surveillance System (NNISS) montrent que cette bactérie est devenue la cinquième cause de pneumopathie et le huitième micro-organisme par ordre de fréquence responsable de bactériémies en réanimation (Gaynes et al., 2005). En milieu hospitalier, la situation épidémiologique est variable en fonction des régions du monde. Par exemple, alors qu'en Europe de l'ouest (Kohlenberg et al., 2009; Naas et al., 2006b; van den Broek et al., 2006), des épidémies de plus ou moins grande ampleur surviennent sur fond épidémique faible, c'est une situation hyper endémique ou d'épidémie permanente qui est plutôt rencontrée en zones inter tropicales (dos Santos Saalfeld et al., 2009; Hsueh et al., 2002), y compris dans certains départements français ou collectivités d'outre-mer comme cela a été rapporté en Polynésie française (Naas et al., 2005).

A. baumannii est principalement à l'origine de pneumopathies sous ventilation, mais cette bactérie peut également être responsable d'infections urinaires, et de façon plus sporadique, de méningites, d'endocardites et de surinfections des plaies d'origine traumatique ou chirurgicale (Cisneros and Rodríguez-Baño, 2002). Elle sévit plus particulièrement en soins intensifs du fait de l'utilisation prépondérante des cathéters, sondes d'intubation et

d'appareils de ventilation mécanique (Gootz and Marra, 2008). La mortalité attribuée aux infections à *A. baumannii* varie de 7,8 % à 23 % et peut atteindre près de 43 % dans les services de soins intensifs (Falagas et al., 2006).

L'une des principales raisons de l'intérêt portée à *A. baumannii* est sa remarquable capacité à acquérir et accumuler des gènes de résistance aux antibiotiques. Alors que les carbapénèmes étaient jusqu'à récemment considérés comme le traitement de choix des souches résistantes aux céphalosporines de troisième génération, des souches résistantes à ces antibiotiques ont émergé dans le monde entier, certaines devenant résistantes à tous les antibiotiques conventionnels. La première souche "toto résistante" a été isolée à Taiwan en 2002 (Hsueh et al., 2002) et depuis, certaines souches ne restant sensibles qu'à la colistine se sont installées à l'état endémique dans des structures de soins.

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 (Jawad et al., 1998). De plus, la colonisation peut persister plusieurs mois chez des patients ayant eu auparavant des prélèvements cliniques positifs (Marchaim et al., 2007). Lors des épidémies, l'environnement hospitalier peut être fortement contaminé par *A. baumannii* et cette contamination est souche dépendante selon le degré d'épidémiogénicité de la souche en cause (Villegas and Hartstein, 2003; Weernink et al., 1995). 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 explique l'ampleur et la durée des phénomènes épidémiques.

4.2. Epidémiologie extra-hospitalière

Au cours des dernières décennies, une augmentation de la fréquence des infections communautaires à *A. baumannii* a été constatée, principalement dans les pays situés en zones inter tropicales (Anstey et al., 2002; Cordes et al., 1981; Leung et al., 2006). Ces infections sont le plus souvent pulmonaires, plus fréquemment observées chez l'homme de plus de 40 ans, en relation avec des facteurs de risque du type tabagisme, alcoolisme, bronchite chronique, cancer ou des antécédents de pneumonie. Elles sont d'évolution grave, avec une mortalité élevée si un traitement efficace n'est pas mis en route dès le début des signes pulmonaires, comme cela est observé en milieu communautaire (Anstey et al., 2002; Leung et al., 2006). Les souches isolées sont fréquemment multi-résistantes aux antibiotiques à l'image

des souches hospitalières, ce qui interroge sur leur origine. Des études réalisées à Taiwan en 2001 et à Singapour en 2009 ont rapporté que 2 cas sur 3 survenaient pendant la période chaude et humide de la mousson, alors qu'aucun cas n'était relevé pendant la période la plus froide de l'année (Chen et al., 2001; Ong et al., 2009). Des infections à *A. baumannii* ont également été constatées lors de conflits armés ou de catastrophes naturelles (Oncül et al., 2002; Scott et al., 2007; Sebeny et al., 2008; Wang et al., 2010).

A. baumannii est l'un des microorganismes les plus isolés des plaies chez les survivants des catastrophes naturelles (Eveillard et al., 2013). Sa présence a été observée lors des séismes en Turquie (Marmara, 1999), au Pakistan (2005), et en Chine (Wenchuan, 2008), mais également lors du tsunami qui a touché l'océan indien en 2004 (Kiani et al., 2009; Oncül et al., 2002; Uçkay et al., 2008; Zhang et al., 2012). L'étude des prélèvements microbiologiques réalisés chez les survivants des catastrophes naturelles admis en milieu hospitalier a montré une répartition bactérienne différente de celle habituellement décrite dans ces mêmes établissements (Eveillard et al., 2013). Par exemple, en Turquie avant le séisme de Marmara, *A. baumannii* ne représente que 7,3 % des microorganismes habituellement isolés alors que cette prévalence a dramatiquement augmenté pour atteindre 31,2 % (Oncül et al., 2002).

A. baumannii a également été isolé chez des patients issus de zones de guerre. Dans ces cas, les patients présentent pour la plupart des infections de la peau et des tissus mous, des infections ostéo-articulaires ou des bactériémies (Johnson et al., 2007; Petersen et al., 2007; Scott et al., 2007). La présence de souches multi-résistantes a été signalée pour la première fois en 2004 chez ses soldats américains blessés en Iraq et Afghanistan (O'Shea, 2012). Cette notoriété particulière observée au cours des conflits d'Iraq a valu à la bactérie le pseudonyme de 'Iraqibacter' (Howard et al., 2012). Récemment, des souches *A. baumannii* productrice de NDM-1 ont été isolées dans des plaies des blessés de guerre syriens à Tripoli au Liban (Rafei et al., 2014). La typologie des situations où ces infections sont diagnostiquées soulève la question d'un potentiel réservoir d'origine environnementale, en particulier tellurique.

5. Réservoir extra-hospitalier d'*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 extra-hospitalier de cette bactérie reste encore méconnu, 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.

5.1. Portage d'*A. baumannii* chez l'Homme

Les *Acinetobacter* font partie de la flore commensale de la peau humaine, et sont surtout retrouvés au niveau des aisselles et de l'aîne (Bergogne-Berezin and Towner, 1996). Toutefois, *A. baumannii*, l'agent pathogène le plus impliqué cliniquement, n'a été rapporté que rarement sur la peau, de 0,5 % à 3 % selon les études (Berlau et al., 1999b; Seifert et al., 1997). Une autre étude a montré la présence de la bactérie dans les selles de 0,9 % des individus sains prélevés au Royaume-Uni et aux Pays-Bas (Dijkshoorn et al., 2005). Néanmoins, Cette situation est différente dans les régions à climat tropical (Peleg et al., 2008). Ainsi, à Hong-Kong, *A. baumannii* est retrouvé sur la peau chez près de 4 % des gens (Chu et al., 1999). Une autre étude réalisée au Senegal, a mis en évidence la présence de la bactérie dans 5,4 % des selles humaines (Kempf et al., 2012b). Enfin, une étude effectuée à New York montre que près de 10 % des résidents de la communauté portent *A. baumannii* sur leurs mains (Zeana et al., 2003).

5.2. *A. baumannii* et environnement

Les espèces du genre *Acinetobacter* sont considérées comme ubiquitaires et peuvent être isolées de différents environnements. Il est estimé que les *Acinetobacter* constituent 0,001% de la population aérobie hétérotrophe totale du sol et de l'eau (Baumann, 1968; Towner, 2006). Il existe cependant peu de données disponibles rapportant la présence environnemental d'*A. baumannii* (Dijkshoorn et al., 2007). Plusieurs études récentes ont montré la présence du pathogène sur des légumes prélevés dans des supermarchés, des commerces de proximité ou dans des jardins particuliers (Berlau et al., 1999a; Houang et al., 2001). *A. baumannii* a également été isolé en Inde et au Kuwait à partir de sols contaminés par des hydrocarbures pétroliers (Obuekwe et al., 2009; Sarma et al., 2004). Certaines souches présentaient des caractéristiques de dégradation du pétrole ou du polluant 4-chloroaniline (Sarma et al., 2004; Vangnai and Petchkroh, 2007). A Hong-Kong, *A. baumannii* a été isolé dans des échantillons de sol (Houang et al., 2001). Enfin, une étude récente conduite en Corée du Sud a montré la présence de la 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). Il est à souligner que pour toutes ces études environnementales, des techniques d'identification moléculaire avaient été utilisées.

5.3. A. *baumannii* chez les animaux

Plusieurs études récentes ont montré la présence du pathogène en milieu agricole (dans du lisier de porc au Royaume Uni et de la fumure) (Byrne-Bailey et al., 2009) et dans des élevages de poissons et de crevettes en Asie du sud-est (Huys et al., 2007). En Ecosse, des prélèvements de selles, de peau, dans les oreilles et dans les narines 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*. La prévalence du portage était de 1,2 %; les souches isolées étaient groupées en 3 clusters différents mais leur profil électrophorétique en champ pulsé était différent de ceux des trois clones humains majeurs qui circulent en Europe ECI, ECII et ECIII (Hamouda et al., 2011). A Hong-Kong, parmi les échantillons de viandes et de poissons analysés, plus d'un sur trois contenait *Acinetobacter* spp., et *A. baumannii* était retrouvé dans toutes les types de prélèvements (Houang et al., 2001).

En 2004, *A. baumannii* a été isolé pour la première fois dans des poux de corps récoltés dans le cadre d'une étude menée sur des personnes sans domicile fixe à Marseille (La Scola and Raoult, 2004). Les auteurs ont suggéré à l'époque que cette contamination pouvait être due à l'ingestion de sang contaminé, cette bactérie n'étant pas communément associée à la peau en Europe à la différence des zones tropicales. Il s'en est suivi une recherche à plus large échelle où des collections de poux de divers pays (Burundi, Rwanda, Pérou, Algérie, Portugal, Pays-Bas, Ethiopie) furent étudiées. Les résultats, ont confirmé la présence de la bactérie dans ces ectoparasites (Kempf et al., 2012a; La Scola and Raoult, 2004). Plus récemment, une étude épidémiologique recherchant *A. baumannii* dans des poux, des selles d'individus et des selles d'animaux domestiques du Sénégal a été menée (Kempf et al., 2012b). Les résultats ont montré la présence de ces bactéries dans les trois types de prélèvements. Enfin, dernièrement cette bactérie a été mise en évidence dans des poux de tête collectés chez des enfants scolarisés dans des écoles primaires de Paris (Bouvresse et al., 2011).

Ces ectoparasites semblent ne pas être les seuls hébergeant *A. baumannii*. En effet, la 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 chagasi* en Amérique (Gouveia et al., 2008) et Geiger *et al.*, ont isolé des *Acinetobacter* sp. dans l'intestin

de mouches tsétsé (*Glossina palpalis palpalis*) en Angola (Geiger et al., 2009). Enfin, sur l'île de réunion, des prélèvements ont été réalisés sur 138 animaux présents dans 9 cliniques vétérinaires et les résultats ont montré une prévalence de portage d'*A. baumannii* de 6,5 % (Belmonte et al., 2014).

6. Résistance aux antibiotiques chez *A. baumannii*

La principale inquiétude associée à *A. baumannii* réside dans sa capacité à acquérir des gènes de résistance aux antibiotiques, conduisant rapidement à une description perpétuelle de nouveaux mécanismes de résistance (Higgins et al., 2013). La résistance antimicrobienne chez *A. baumannii* peut être obtenue par deux mécanismes principaux : l'acquisition de nouveaux déterminants de résistance par le biais d'éléments génétiques mobiles (séquences d'insertions, transposons, intégrons, plasmides et récemment les îlots de résistance) et la modification génétique de gènes endogènes à la bactérie (Roca et al., 2012). Fournier et ses collègues (Fournier et al., 2006) ont comparé en 2006 le génome de la souche AYE, productrice de β -lactamase à large spectre VEB-1 et responsable d'une épidémie en Nord France, et celui de la souche sensible SDF, isolée de poux de corps. Cette comparaison a révélé la présence chez la souche AYE d'une large région de 86 kb appelée îlot de résistance (AbaR1) contenant un groupe de 45 gènes de résistance (Figure 5). La position homologue chez la souche SDF contenait un îlot de 20 Kb dépourvu des gènes de résistance. La découverte de cette structure a permis d'expliquer pour la première fois le phénomène d'acquisition rapide des déterminants de résistance sous la pression des antibiotiques chez *A. baumannii*. Dans ce volet, nous allons détailler les mécanismes de résistance aux bêta-lactamines ainsi qu'aux autres antibiotiques (Tableau 3).

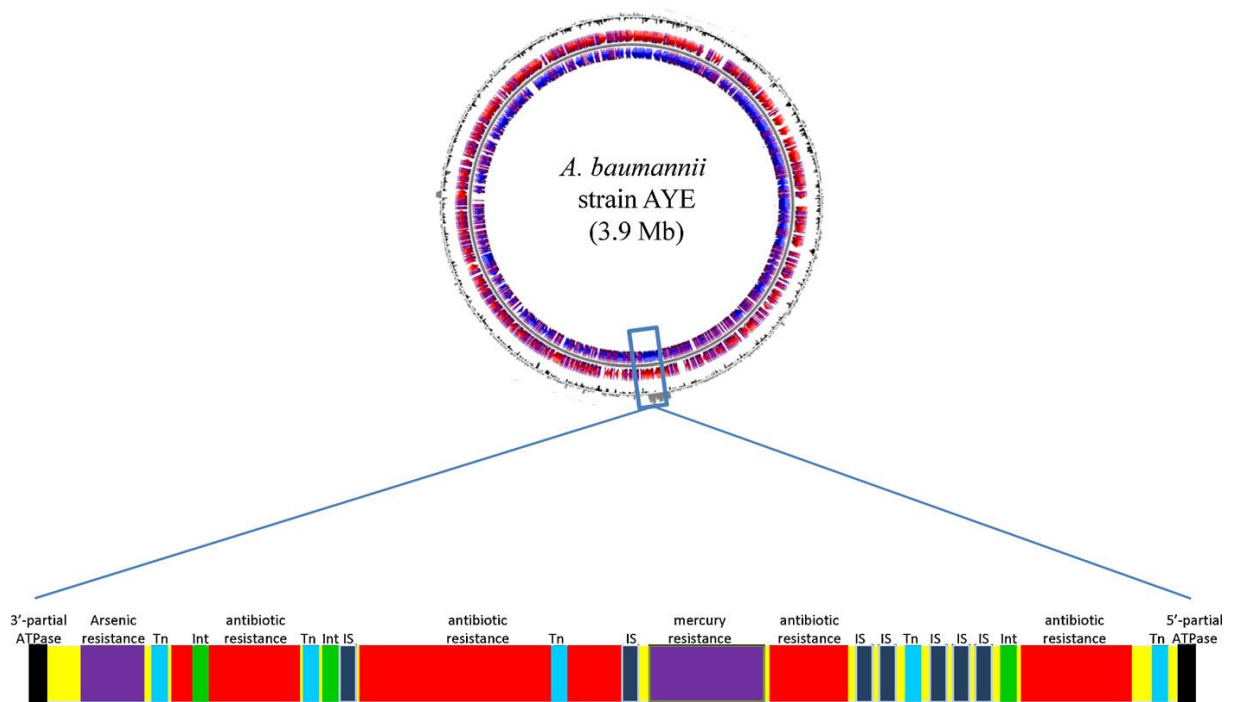


Figure 5 : Contexte génétique de l'îlot de résistance de 86 Kb chez *A. baumannii*-souche AYE. Tn: Transposase, Int: intégrase, IS: séquence d'insertion (Kempf and Rolain, 2012).

6.1. Résistance naturelle

A. baumannii est naturellement résistant aux aminopénicillines, aztréonam, céphalosporines 1^{ère} et 2^{ème} génération, ertapénème, fosfomycine, triméthoprime et aux furanes.

6.2. Résistance acquise aux bêta-lactamines

La résistance aux bêta-lactamines chez *A. baumannii* est liée principalement à la production des β -lactamases, mais des mécanismes de résistance non-enzymatiques sont également retrouvés (Bonnin et al., 2013b; Roca et al., 2012) (Figure 6), (Tableau 3).

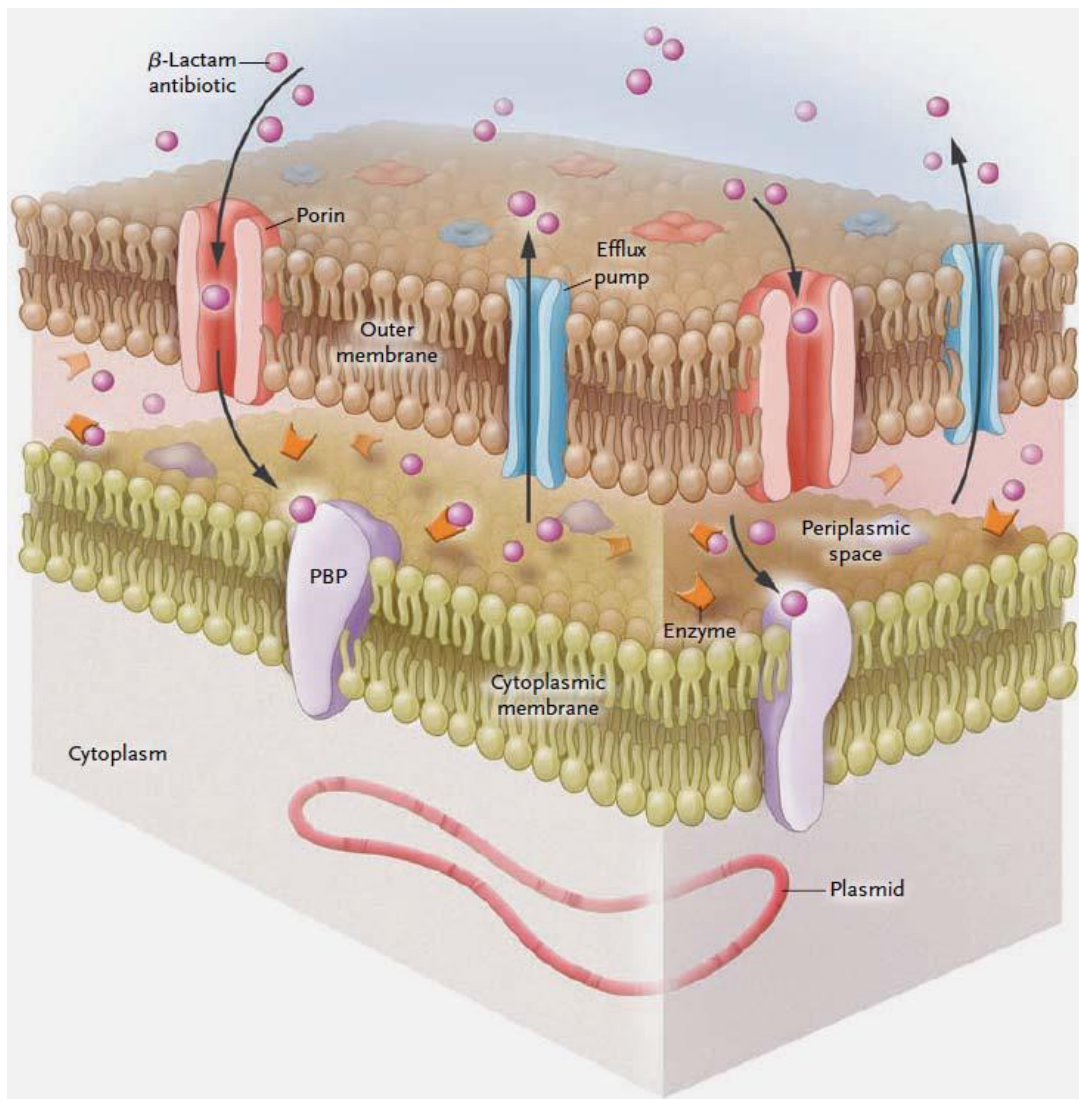


Figure 6 : Mécanismes de résistance aux β -lactamines. *Acinetobacter* comme toute autre bactérie à Gram négatif possède une membrane externe et une membrane cytoplasmique. Les β -lactamases (β -lactamases à large spectre, céphalosporinases et les carbapénèmases) se trouvent dans l'espace périplasmique (entre les deux membranes). Les protéines liant les pénicillines (PLP) localisées au niveau de membrane cytoplasmique constituent la cible finale des β -lactamines. Ces antibiotiques doivent traverser la membrane externe en passant par les porines (protéines de membrane externe, Outer membrane protein ou OMP). Une fois dans l'espace périplasmique, ils se lient aux PLP(s). Les β -lactamines peuvent être excrétées activement en dehors de la structure bactérienne par des pompes efflux. *Acinetobacter* peut posséder des intégrons ou transposons, éléments génétiques sur le chromosome bactérien ou sur les plasmides, qui peuvent porter des cassettes multiples avec des gènes de résistance (ex: β -lactamases à large spectre ou métallo- β -lactamases) (Munoz-Price and Weinstein, 2008).

6.2.1. Mécanismes enzymatiques

6.2.1.1. La surproduction des β -lactamases intrinsèques

A. La céphalosporinase chromosomique (AmpC)

Les souches d'*A. baumannii* produisent une céphalosporinase naturelle (AmpC), définie également comme "Acinetobacter-derived cephalosporinases" ou ADC. Actuellement, il y a plus de 67 variants d'ADC(s) identifiés dans le genre *Acinetobacter* (Evans et al., 2013). Les ADC(s) sont exprimés normalement à bas niveau, conférant une résistance aux aminopénicillines et aux céphalosporines 1^{ère} et 2^{ème} génération. Contrairement aux autres bactéries à Gram négatif, ces gènes ne sont pas inductibles, dû au fait de l'absence de régulateur en amont du gène *bla_{ampC}* (Bou and Martínez-Beltrán, 2000). La résistance aux céphalosporines à large spectre peut être due à l'insertion d'une séquence d'insertion (*ISAbal*) en amont du gène qui contient des séquences promotrices responsable à sa surexpression (Hamidian and Hall, 2013; Héritier et al., 2006). Parallèlement, des mutations ponctuelles peuvent aboutir à la formation des céphalosporinases à large spectre (Bonnin et al., 2013b; Rodríguez-Martínez et al., 2010; Tian et al., 2011).

B. L'oxacillinase chromosomique (OXA-51)

Outre la céphalosporinase, *A. baumannii* produit une autre β -lactamase naturelle appartenant à la classe D ou oxacillinase OXA-51, identifiée ubiquitaire chez cette espèce (discutée avant dans la partie de l'identification moléculaire). La première enzyme, OXA-51, a été décrite pour la première fois en 2005 chez une souche résistante aux carbapénèmes isolée en 1996 en Argentine (Brown et al., 2005). Après cette première description, plusieurs autres variants ont été identifiés, contribuant à la formation d'un plus grand groupe de β -lactamases OXA-51 (95 variants) (Evans and Amyes, 2014). Dans la présente thèse, nous avons décrit 19 nouveaux variants d'OXA-51. Cette diversité s'est révélée très intéressante pour l'identification des clones épidémiques (voir la revue pour plus de détail). Généralement, ces gènes présentent une faible activité hydrolytique vis-à-vis carbapénèmes (Héritier et al., 2005a), et ne peuvent pas contribuer à la résistance à ces antibiotiques, sauf en cas d'intégration de séquences d'insertion (comme *ISAbal*) en amont de ces gènes (Turton et al., 2006a; Zander et al., 2013a).

6.2.1.2. Acquisition des β -lactamases à spectre étroit ou à spectre étendu

Différentes β -lactamases à spectre étroit ont été caractérisées chez *A. baumannii*: celles qui sont inhibées par l'acide clavulanique comme TEM-1, TEM-2, CARB-4, CARB-5, CARB-14, SHV-1, SHV-56, SHV-71 et SCO-1, et celles qui sont résistantes à l'action de l'acide clavulanique comme OXA-21 et OXA-37 (Bonnin et al., 2013b). Généralement, ces enzymes peuvent hydrolyser les pénicillines à spectre étroit, mais pas les céphalosporines et les carbapénèmes (Bonnin et al., 2013b). Récemment, TEM-1 a été décrit comme pouvant être impliqué dans la résistance au sulbactam (Krizova et al., 2013).

L'acquisition des β -lactamases à spectre étendu (BLSE), conférant une résistance à l'ensemble des bêta-lactamines à l'exception des carbapénèmes, est un phénomène peu fréquent chez *Acinetobacter* (Decré, 2012). La première BLSE identifiée chez *A. baumannii* était de type PER-1 (Vahaboglu et al., 1997). Aujourd'hui, ce gène est largement décrit en Europe, Turquie, Russie, Etats-Unis, Chine, Inde, Corée et Iran (Eraç et al., 2013; Farajnia et al., 2013; Kempf and Rolain, 2012). Plusieurs variants ont été décrits comme PER-7 en France et aux Emirats Arabe Unis, et qui présente une activité hydrolytique bien supérieure vis-à-vis des céphalosporines et de l'aztréonam (Bonnin et al., 2011b; Opazo et al., 2012). L'enzyme VEB-1 a été à l'origine d'une large épidémie en France. D'avril 2003 à juin 2004, 275 isolats isolés de 53 hôpitaux portaient le gène *bla*_{VEB-1} et appartenaient au même clone (Naas et al., 2006b). Des souches d'*A. baumannii* porteuses du gène *bla*_{VEB-1} ont également été isolées dans d'autres pays comme la Belgique et l'Iran (Farajnia et al., 2013; Naas et al., 2006a). Plusieurs variants de BLSE, de type SHV, TEM, CTX-M et GES, ont été décrits (Bonnin et al., 2013b; Zhao and Hu, 2012). Récemment, CTX-M-15, la BLSE la plus disséminée dans le monde, a été détectée chez *A. baumannii* (Potron et al., 2011).

6.2.1.3. Acquisition des β -lactamases conférant la résistance aux carbapénèmes, ou carbapénèmases

Différentes carbapénèmases ont été identifiées chez *A. baumannii*. Elles appartiennent à la classe A, B (ou métallob- β -lactamases) et à la classe D de la classification d'Ambler.

A. Les β -lactamases de classe A

Parmi les β -lactamases de classe A, des enzymes à activité carbapénémase ont pu être identifiées chez *A. baumannii*. Elles sont cependant plus rarement retrouvées que chez les entérobactéries (Decré, 2012). C'est le cas par exemple de la β -lactamase KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) et de ses variants KPC-2, KPC-3, KPC-4, KPC-10 identifiés à Puerto Rico (Robledo et al., 2010) ou encore des enzymes GES-11 et GES-14 identifiées chez des souches d'*A. baumannii* isolées en Belgique, en Egypte, en Turquie, en France, et au Kuwait (Al-Agamy et al., 2014a; Bogaerts et al., 2010; Bonnin et al., 2013c, 2011a; Zeka et al., 2014).

B. Les β -lactamases de classe B

Les β -lactamases de cette classe (dénommées ainsi métallob- β -lactamases) diffèrent des celles de classe A, C, et D car elles possèdent un ou deux métaux de Zinc dans leur site actif. Ces enzymes peuvent inactiver l'ensemble des β -lactamines à l'exception de l'aztréonam (Evans et al., 2013). Leur activité hydrolytique est considérée 100 à 1000 fois plus élevée que celles des carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamases (CHDL(s)) (Poirel and Nordmann, 2006a). Les métallob- β -lactamases sont peu rapportées chez *A. baumannii* et 4 groupes ont été identifiés à ce jour: Imipenem β -lactamase (IMP), Verona integron-encoded metallo- β -lactamase (VIM), Seoul imipenemase (SIM) and New Delhi metallo- β -lactamase (NDM) (Bonnin et al., 2013b; Kempf and Rolain, 2012; Poirel and Nordmann, 2006a; Roca et al., 2012; Zhao and Hu, 2012).

Depuis la première description de NDM-1 chez des souches d'entérobactéries (*K. pneumoniae* et *Escherichia coli*) isolées en Suède d'un patient hospitalisé en Inde (Yong et al., 2009); ce gène a été largement disséminé chez les entérobactéries mais également chez *Acinetobacter* (Dortet et al., 2014). Actuellement, 8 variants de NDM(s) ont été rapportés (NDM-1 à NDM-8) dont deux (NDM-1 et NDM-2) décrits chez *Acinetobacter* (Dortet et al., 2014). La première identification de NDM-1 chez *A. baumannii* était en 2010, chez des souches isolées de patients hospitalisés en unité de soins intensifs en Inde. Ces souches contenaient par ailleurs les gènes *bla*_{OXA-23} et *armA* (Karthikeyan et al., 2010). Plus tard, des souches d'*A. baumannii* possédant ce gène ont été isolées dans différents régions du monde: Allemagne (Göttig et al., 2010; Pfeifer et al., 2011), République de tchèque (Hrabák et al.,

2012; Krizova et al., 2012), Algérie (Boulanger et al., 2012), Chine (Chen et al., 2011; Zhang et al., 2013), Belgique (Bogaerts et al., 2012), France, Slovénie, Suisse (Bonnin et al., 2013a, 2012; Decousser et al., 2013), Japon (Nakazawa et al., 2013), Pakistan (Hasan et al., 2014), Liban (Rafei et al., 2014), et Kenya (Revathi et al., 2013) mais également chez d'autres espèces du genre *Acinetobacter* (McGann et al., 2013; Pasteran et al., 2014). Il faut noter que la plupart des cas observés en Europe ont été importés de régions des Balkans, de Méditerranée ou de l'Afrique. Par ailleurs, Le deuxième variant (NDM-2) a été décrit pour la première fois en Allemagne d'un patient hospitalisé en Egypte (Kaase et al., 2011), puis au Moyen-Orient (Espinal et al., 2013). Ces gènes peuvent être plasmidiques mais sont principalement chromosomiques, associés au transposon de type Tn125 et de ses dérivés (Bonnin et al., 2012; Chen et al., 2011).

C. Les β -lactamases de classe D

Les β -lactamases de classe D, ou oxacillinases, constituent un groupe hétérogène. Généralement, elles sont distinguées par leur capacité à hydrolyser l'oxacilline et la cloxacilline plus rapidement que les benzylpénicillines (d'où le préfixe OXA), mais pas les carbapénèmes (Poirel et al., 2010). Les oxacillinases trouvées chez *Acinetobacter* forment un groupe atypique qui peuvent hydrolyser les carbapénèmes mais faiblement les céphalosporines à large spectre, d'où leur nom, les CHDL (oxacillinases à propriétés de carbapénémase - carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamases) (Bonnin et al., 2013b; Roca et al., 2012). Les CHDL(s) sont les carbapénémases les plus fréquemment rencontrées chez *Acinetobacter* (Bonnin et al., 2013b). Chez *A. baumannii*, 6 classes de CHDL(s) ont été identifiées: 5 groupes des CHDL(s) acquis (OXA-23, OXA-24/40, OXA-58, OXA-143, OXA-235) et le groupe de CHDL(s) naturels (OXA-51).

OXA-23-like

La première carbapénémase décrite chez *A. baumannii*, OXA-23 (initialement ARI-1), a été observée dès 1985 chez une souche imipénème résistante isolée en Ecosse avec une CMI vis-à-vis de cet antibiotique de 16 mg/L (Paton et al., 1993). Par la suite, 18 variants ont été identifiés (OXA-27, OXA-49, OXA-73, OXA-102, OXA-103, OXA-105, OXA-133, OXA-134, OXA-146, OXA-165-OXA-171, OXA-225, OXA-239) chez plusieurs espèces d'*Acinetobacter* ainsi chez des entérobactéries comme *Proteus mirabilis* (Evans and Amyes,

2014; Zander et al., 2014). Ces gènes présentent un support plasmidique ou chromosomique et sont associés généralement avec 4 structures génétiques, des transposons de type 2006, 2007 et 2008 ou simplement *ISAbal* (Mugnier et al., 2010). *A. radioresistens* a été récemment identifié comme étant l'ancêtre de ce groupe (Poirel et al., 2008). Ce gène est le CHDL le plus rapporté mondialement chez *A. baumannii* (Adams-Haduch et al., 2011; Al-Agamy et al., 2014a; Bonnin et al., 2013b; Fu et al., 2010; Grosso et al., 2011a; Mugnier et al., 2010).

OXA-24/40-like

Le second groupe de CHDL a été identifié chez des isolats carbapénèmes résistants lors d'une épidémie en Espagne (Bou et al., 2000). Subséquemment, 6 variants (OXA-25, OXA-26, OXA-72, OXA-139, OXA-160, OXA-207) ont été identifiés chez les espèces *Acinetobacter* ainsi que chez *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae* (Evans and Amyes, 2014; Zander et al., 2014). Ce groupe de gènes peut être chromosomique ou plasmidique et entouré par des sites de recombinaison de type XerC/XerD (Bou et al., 2000; Merino et al., 2010). Ce groupe est rapporté principalement en Espagne, au Portugal (Bou et al., 2000; Grosso et al., 2011b; Lopez-Otsoa et al., 2002; Villalón et al., 2013), mais encore en d'autre pays en Europe, Afrique, Amérique et en Asie (Al-Agamy et al., 2014a; D'Andrea et al., 2009; Ji et al., 2014; Kempf and Rolain, 2012; Lolans et al., 2006; Lu et al., 2009).

OXA-58-like

La première enzyme de ce groupe a été identifiée chez une souche résistante aux carbapénèmes et isolée à Toulouse en 2003 (Poirel et al., 2005). Trois autres variants (OXA-96, OXA-97, OXA-164) ont été identifiés chez différentes espèces de genre *Acinetobacter* et chez des entérobactéries (Evans and Amyes, 2014; Zander et al., 2014). Les gènes de ce groupe sont fréquemment d'origine plasmidique et associés avec des séquences d'insertion comme *ISAbal*, *ISAbal2*, *ISAbal3*, *IS18*, ce qui favorise leur expression (Bonnin et al., 2013b; Poirel and Nordmann, 2006b). Ce groupe de gènes a été rapporté fréquemment en Europe et dans différents régions du monde tel que le Liban (Coelho et al., 2006; Evans et al., 2013; Gogou et al., 2011; Kempf and Rolain, 2012; Zarrilli et al., 2008).

OXA-143-like

Ce quatrième groupe de gènes a été rapporté chez une souche imipénème résistante isolée en Brésil en 2004. Il est porté sur un plasmide de 30 kb et n'est pas associé avec des séquences d'insertion ou encore des intégrons (Higgins et al., 2009). Quatre variants (OXA-

182, OXA-231, OXA-253, OXA-255) ont été détectés chez *A. baumannii*, *A. pittii* et *A. nosocomialis* (Evans and Amyes, 2014; Ji et al., 2014; Lee et al., 2013; Zander et al., 2014). La répartition géographique de ce groupe de gènes n'est pas très claire et sa prévalence réelle n'est pas déterminée. A ce jour, ce groupe a été détecté au Brésil, en Amérique, en Corée et en Chine (Ji et al., 2014; Kim et al., 2010; Lee et al., 2013; Mostachio et al., 2012; Zander et al., 2014).

OXA-235-like

Ce dernier groupe d'oxacillinasés a été caractérisé récemment, en 2013, chez 10 souches d'*A. baumannii* résistantes aux carbapénèmes isolées aux Etats-Unis et au Mexique. Trois variants ont été détectés chez ces isolats OXA-235, OXA-236, OXA-237 avec un support génétique chromosomique ou plasmidique (Higgins et al., 2013). Un nouveau variant, OXA-278, a été détecté sur le chromosome d'une souche *A. schindleri* productrice de NDM-1 et isolée chez militaire américain en Afghanistan (McGann et al., 2013).

6.2.2. Mécanismes non enzymatiques

Outre les mécanismes enzymatiques, l'implication de systèmes d'efflux, des modifications ou la perte des porines, et des modifications des protéines liant les pénicillines (PLP) est également rapportée dans la résistance aux β -lactamines (dont les carbapénèmes) chez *A. baumannii*.

Il existe beaucoup moins des porines chez *A. baumannii* que chez *E. coli*, ce qui rend *Acinetobacter* 100 fois moins perméable qu'*E. coli* (Decré, 2012). Les études portant sur la caractérisation des ces protéines de membrane externe (Outer Membrane Protein ou OMP) sont peu nombreuses, mais elles révèlent toutes un rôle important dans la résistance (Roca et al., 2012). Il a été montré que la perte de la protéine de membrane externe CarO (29 kDa), suite à l'interruption par des séquences d'insertion, pouvait induire une résistance aux carbapénèmes (Mussi et al., 2005). Un site spécifique de liaison à l'imipénème a récemment été décrit sur cette protéine (Catel-Ferreira et al., 2011). D'autres protéines de membrane externe jouent également un rôle dans la résistance aux β -lactamines. Ces protéines ont été identifiées comme les 47 kDa, 44 kDa, 37 kDa, 33-36 kDa, 22-33 kDa, heat-modifiable protein (HMP-AB), 43 kDa (homologue à OprD chez *P. aeruginosa*) (Peleg et al., 2008; Poirel and Nordmann, 2006a; Roca et al., 2012).

L'analyse du génome d'*A. baumannii* a démontré la présence d'un large nombre de pompes à efflux appartenant aux familles RND (Resistance-Nodulation-Division), MFS (Major Facilitator Superfamily), MATE (Multidrug and toxic Compound Extrusion), SMR (Small Multidrug Resistance), ABC (ATP Binding Cassette) (Coyne et al., 2011; Decré, 2012). Parmi elles, deux pompes à efflux, AdeABC (pour *Acinetobacter* drug efflux) et AdeIJK appartenant aux systèmes RND, sont les plus importantes et peuvent expulser des bactéries un large nombre de substrats incluant les antibiotiques (dont les β -lactamines) (Coyne et al., 2011; Roca et al., 2012). La surexpression de AdeABC en association avec les enzymes de type CHDL peuvent augmenter le niveau de résistance aux carbapénèmes (Héritier et al., 2005b; Lee et al., 2010). AdeIJK est une pompe spécifique d'*A. baumannii* qui contribue à la résistance intrinsèque de bas niveau aux β -lactamines et aux autres antibiotiques, à l'exclusion des aminosides (Coyne et al., 2011; Decré, 2012).

Actuellement, 7 PLP(s) ont été identifiés chez *A. baumannii*: PLP1a, PLP1b, PLP2, PLP3, PLP5/6, PLP6b, PLP7/8 (Cayô et al., 2011). L'implication de ces PLP(s) dans la résistance n'est pas totalement clarifiée, mais il semble que la régulation de l'expression de PLP2 et PLP6b pourrait être associée à la résistance aux carbapénèmes (Cayô et al., 2011; Fernández-Cuenca et al., 2003).

6.3. Résistance acquise aux aminosides

La résistance aux aminosides chez *A. baumannii* est due principalement à la production d'enzymes modificatrices. Les trois types d'enzymes: aminoside acétyltransférase (AAC), aminoside nucléotidyltransférase (ANT), aminoside phosphotransférase (APH) ont été rapportés fréquemment chez cette bactérie. En Europe, 84 % des isolats contiennent 2 à 5 gènes de résistance aux aminosides (Nemec et al., 2004b). Les principales enzymes trouvées sont AAC(3')-I, modifiant la gentamicine, APH (3')-VI, modifiant l'amikacine, la kanamycine et la néomycine, et AAC (6')-Ib, modifiant la tobramycine, la nétilmicine et l'amikacine (Bonnin et al., 2013b). Le second mécanisme de résistance aux aminosides implique une méthylation de l'ARNr 16S par les enzymes ArmA, ce qui confère une résistance croisée à la totalité des aminosides (Bonnin et al., 2013b; Xiao et al., 2014). Les gènes *armA* ont été décrits à travers le monde (Peleg et al., 2008; Roca et al., 2012). Enfin, la résistance aux aminosides peut être associée à deux pompes à efflux: la pompe AdeABC et la pompe AbeM de type MATE (Decré, 2012; Roca et al., 2012).

6.4. Résistance acquise aux quinolones

La résistance aux quinolones est principalement liée à des mutations ponctuelles au niveau de la région appelée "quinolone resistance determining region" (région déterminant la résistance aux quinolones - "QRDR") et notamment des gènes *gyrA* et *parC*, gènes codant l'ADN gyrase et la topo-isomérase IV (Bonnin et al., 2013b). La principale mutation retrouvée chez la protéine GyrA est le remplacement d'une sérine par une leucine en position 83, et chez la protéine ParC, c'est le remplacement d'une sérine par une leucine en position 80 (Roca et al., 2012). Généralement, les mutations dans le gène *parC* interviennent lorsque le gène *gyrA* est déjà muté (Vila et al., 1997). Récemment, un troisième type de mutation intervenant au niveau du gène *gyrB* a été décrit (Park et al., 2011). L'accumulation des mutations peut aboutir à une résistance de haut niveau aux quinolones (Park et al., 2011; Vila et al., 1997). Les systèmes d'efflux de type RND (AdeABC, AdeIJK, AdeFGH), MATE (AbeM) ou SMR (AbeS) participent également à la résistance aux fluoroquinolones (Roca et al., 2012). A ce jour, la résistance plasmidique aux quinolones chez *Acinetobacter* n'a pas été mise en évidence.

6.5. Résistance acquise à la colistine

La colistine exerce un effet bactéricide sur les bactéries à Gram négatif en interagissant avec le lipide A de lipopolysaccharide (LPS). La résistance à la colistine chez l'espèce *A. baumannii* reste rare, bien qu'elle soit bien documentée dans le monde entier (Cai et al., 2012). Deux mécanismes ont été décrits pour la résistance à la colistine chez *A. baumannii*: le premier correspond à la perte totale de lipopolysaccharide (LPS) suite à l'inactivation des gènes de biosynthèse de lipide A (*lpxA*, *lpxC*, *lpxD*) (Moffatt et al., 2011, 2010) ; le deuxième mécanisme implique une modification du lipide A suite à des mutations ou une surexpression du système de régulation PmrAB (Beceiro et al., 2011).

Tableau 3 : Récapitulatif des mécanismes de résistance rapportés chez *A. baumannii*
(Higgins et al., 2013; Park et al., 2011; Roca et al., 2012).

Antibiotique	Mécanisme de résistance	Classe	Exemples
β-lactamines	β-lactamases	Classe A	TEM, SHV, SCO-1, CARB, PER, VEB, CTX-M, GES, KPC
		Classe B	IMP, VIM, SIM-1, NDM
		Classe C	AmpC
		Classe D	OXA-2, OXA-10, OXA-20, OXA-37, OXA-23-like, OXA-24/40-like, OXA-51-like, OXA-58-like, OXA-143-like, OXA-235-like
Aminosides	Diminution de la perméabilité		CarO, protéines 47 kDa, 44 kDa, 37 kDa, 33-36 kDa, 22-33 kDa, HMP-AB, 43 kDa
	Pompes à efflux Modification de PLP Enzymes modificatrices	RND	AdeABC, AdeIJK PLP2 aminoside acétyltransférase (AAC), aminoside nucléotidyltransférase (ANT), aminoside phosphotransférase (APH)
	Méthylation de la cible Pompes à efflux	RND MATE	ArmA AdeABC AbeM
Quinolones	Mutation de la cible		GyrA/GyrB/ParC
	Pompes à efflux	RND MATE SMR	AdeABC, AdeIJK, AdeFGH AbeM AbeS
Chloramphénicol	Pompes d'efflux	RND	AdeABC, AdeIJK, AdeFGH
		MFS	CmlA, CraA
		MATE	AbeM
		SMR	AbeS
Tétracyclines	Pompes à efflux	MFS	TetA, TetB
	Protection ribosomale		TetM
Tigécycline	Pompes à efflux	RND	AdeABC, AdeIJK
Polymixine (colistine)	modification de lipide A		PmrAB
	Perte du lipopolysaccharide		LpxABC

Les carbapénèmes sont écrits en gras

6.6. Traitement des infections à *A. baumannii*

Les β-lactamines, en association avec les aminosides ou les fluoroquinolones présentent la meilleure activité bactéricide contre les souches sensibles (Bonnin et al., 2013b).

Néanmoins, la résistance à ces antibiotiques, y compris aux carbapénèmes, est de plus en plus rapportée, ce qui limite les options thérapeutiques. Le sulbactam (un inhibiteur de β -lactamase ayant une activité intrinsèque sur *A. baumannii*), la colistine (polymixine) et la tigécycline (glycyclines) sont considérés comme des traitements efficaces pour les infections à souches multirésistantes (Dijkshoorn et al., 2007; Gordon and Wareham, 2010). Toutefois, l'utilisation de tigécycline n'est pas toujours recommandée du fait de l'émergence *in vivo* de souches résistantes à cet antibiotique durant le traitement (Kempf and Rolain, 2012). Les thérapies combinatoires révèlent une meilleure activité contre les souches multirésistantes, comme la combinaison de carbapénèmes avec d'autres molécules classiques telles que la colistine, la rifampicine ou encore le sulbactam (Bonnin et al., 2013b; Dijkshoorn et al., 2007; Gordon and Wareham, 2010).

7. Pathogénicité et mécanismes de virulence

Malgré le fait qu'*A. baumannii* soit considéré comme un agent pathogène émergent, on ne connaît que peu de choses sur les facteurs de pathogénicité et de virulence de cette bactérie (Tableau 4).

A. baumannii présente une capacité à survivre sur des surfaces abiotiques telles que les meubles, les drapes et les équipements médicamenteux (cathéters, équipements respiratoires) mais également sur des surfaces biotiques telles que les cellules épithéliales humaines ou encore les filaments mycéliens de *Candida albicans* (McConnell et al., 2013; Roca et al., 2012). Cette aptitude à adhérer et à persister sur ces environnements réfère à sa capacité à former des biofilms. Les biofilms 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). Conséquemment la capacité à générer des biofilms contribue à la pathogénicité d'*A. baumannii* (McConnell et al., 2013). Le développement des biofilms chez cette espèce implique une large gamme de facteurs bactériens tels que les pilis, les protéines de membrane externe (OmpA, biofilms-associated protein 'Bap'), la production d'exopolysaccharides (poly- β -1-6-N-acetylglucosamine 'PNAG'), le système de régulation à deux composants BfmRS (Choi et al., 2009; Gaddy and Actis, 2009; Gaddy et al., 2009; Loehfelm et al., 2008; Tomaras et al., 2008, 2003), mais également des facteurs cellulaires et

environnementaux comme les molécules de signalisation du quorum sensing, la température ou encore la disponibilité en fer (McConnell et al., 2013; Mussi et al., 2010; Niu et al., 2008). Par ailleurs, une corrélation a été trouvée entre l'expression du gène de résistance *bla*_{PER-1}, et la quantité de biofilm formée sur les plastiques ou encore l'adhérence des bactéries sur les cellules épithéliales (Lee et al., 2008).

Les nouvelles approches de séquençage génomique ont fourni des nouvelles connaissances sur la pathogénèse d'*A. baumannii*. Smith et ses collègues ont réalisé une comparaison génomique entre *A. baumannii* et la bactérie environnementale *A. baylyi*. Une des différences les plus intéressantes entre ces deux génomes était la présence chez *A. baumannii* de 28 îlots étrangers putatifs (putative alien islands 'PA'). Un nombre remarquable de ces îlots (n=16) contenait des gènes associés à la pathogénèse et qui codaient notamment pour la résistance aux métaux lourds, le métabolisme et l'assimilation du fer, les fimbriae et la biogenèse de la paroi cellulaire (Smith et al., 2007).

En outre, un des facteurs de virulence les plus caractérisés chez *A. baumannii* est la protéine de la membrane externe OmpA, qui est la protéine de surface la plus abondante. De masse moléculaire de 38 kDa, elle est impliquée dans l'adhérence, l'invasion des cellules épithéliales et l'induction de l'apoptose durant les étapes initiales de l'infection par *A. baumannii* (Choi et al., 2008b). Cette dernière propriété réside dans la capacité de la bactérie à envoyer des molécules vers les mitochondries et les noyaux cellulaires de l'hôte et à induire les voies d'apoptose chez les cellules de l'hôte (Choi et al., 2008a, 2005). Les autres rôles de cette protéine dans la pathogénicité d'*A. baumannii* sont reportées dans le [tableau 4](#).

Le rôle potentiel du lipopolysaccharide (LPS) dans la pathogénèse chez *A. baumannii* a été récemment caractérisé. Luke et ses collègues ont montré que les mutants de LPS présentaient une atténuation de leur résistance au sérum humain ainsi que de leur virulence *in vivo*. Ils ont ainsi montré que le LPS pouvait fournir un avantage compétitif pour la survie *in vivo* d'*A. baumannii* (Luke et al., 2010). Néanmoins, il peut déclencher la réponse immunitaire innée *via* le Toll-like receptor 4 (TLR4) (Erridge et al., 2007; Knapp et al., 2006).

Outre le LPS, la capsule est considérée comme un facteur de pathogénicité chez *A. baumannii*. Russo et ses collègues ont montré que les mutants dépourvus de capsule présentaient une croissance réduite dans le sérum humain et dans le liquide d'ascite (Russo et al., 2010).

Les phospholipases bactériennes contribuent à la pathogénèse des bactéries à 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). Il a été montré que l'inactivation de la phospholipase D induisait une réduction de capacité de l'organisme à survivre dans le sérum et à envahir les cellules épithéliales ainsi qu'une virulence atténuée dans un modèle murin de pneumonie (Jacobs et al., 2010).

Les protéines liant les pénicillines participent à la synthèse du peptidoglycane, et par conséquent à la stabilité des bactéries (McConnell et al., 2013). Russo et ses collègues ont démontré que la PLP7/8 (PLP de faible poids moléculaire) contribuait à la pathogénicité d'*A. baumannii* et participait à sa croissance et sa survie dans l'ascite chez l'homme (Russo et al., 2009).

Les vésicules de membrane externe (outer membrane vesicle, OMV) sont des nanovésicules sphériques de diamètre moyen de 20 à 200 nm, composées de LPS, de protéines de membrane externe, de protéines périplasmiques, protéines cytoplasmiques, lipides, d'ADN et d'ARN. La sécrétion de ces vésicules est l'un des principaux mécanismes par lesquels les bactéries à Gram négatif fournissent des molécules effectrices aux cellules hôtes. *A. baumannii* secrète des OMV(s) *in vitro* durant la croissance et *in vivo* lors des infections. Parmi les protéines associées aux OMV(s) chez *A. baumannii*, OmpA et plusieurs autres facteurs putatifs de virulence ont été identifiés (Jin et al., 2011; Kwon et al., 2009). Les OMV(s) d'*A. baumannii* interagissent avec la membrane plasmique et délivrent OmpA à l'intérieur des cellules eucaryotes (Jin et al., 2011). La présence du gène *bla*_{OXA-24} a été récemment mise en évidence dans les OMV(s), ce qui souligne le rôle de ces derniers dans le transfert horizontal et la dissémination de résistance antimicrobienne chez *A. baumannii* (Rumbo et al., 2011).

A. baumannii acquiert le fer soit par l'utilisation de l'hème comme une source de fer, soit par l'action des sidérophores. A ce jour, au moins 5 clusters de gènes codant pour la synthèse de sidérophores et leur transport ont été identifiés chez *A. baumannii*: sidérophore souche 8399, 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 ses collègues ont démontré que la présence des protéines BasD et BauA (protéines nécessaires pour la

biosynthèse de l'acinetobactine et son transport respectivement) était un élément critique pour la capacité de la souche *A. baumannii* ATCC 19606^T de persister et causer la mort des cellules épithéliales humaines, mais également ainsi pour exprimer la virulence dans les modèles animaux (la larve *Galleria mellonella* et la souris) (Gaddy et al., 2012).

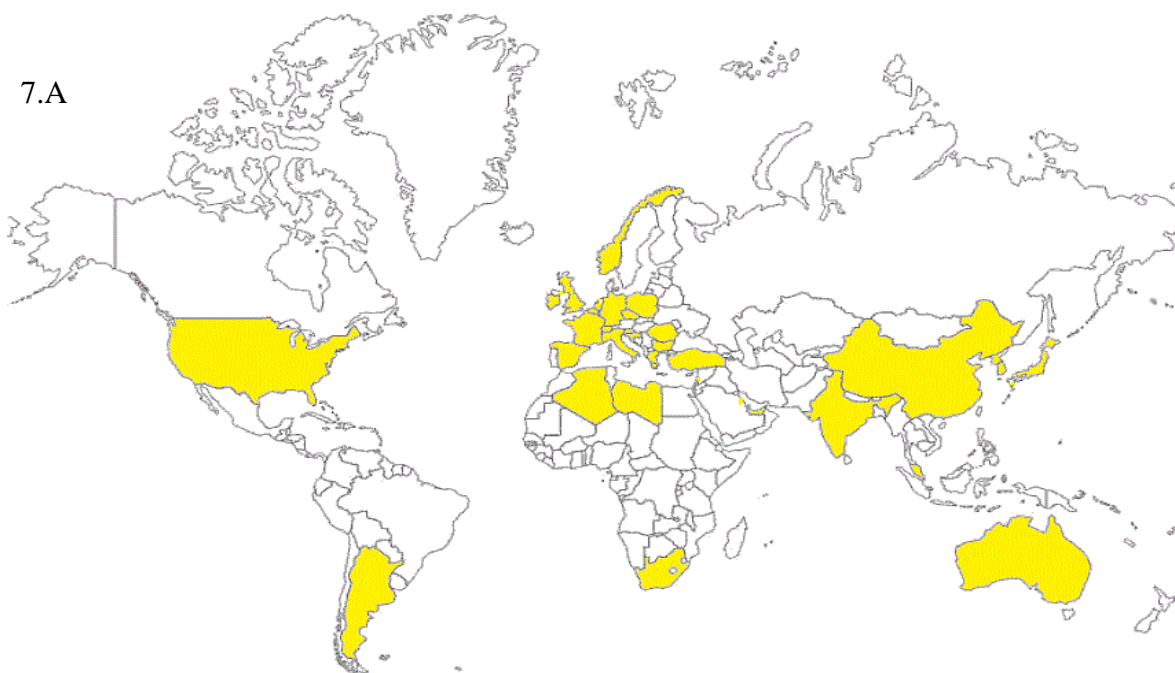
Tableau 4 : Facteurs de virulence identifiés chez *A. baumannii* (McConnell et al., 2013).

Facteur de virulence (gène)	Rôle proposé dans la pathogénèse
OmpA (<i>ompA</i>)	Induction de l'apoptose des cellules d'hôtes, adhérence et l'invasion des cellules épithéliales, formation de biofilm, mobilité sur surface, résistance au sérum
Lipopolysaccharide (<i>lpsB</i>)	Echappement au système immunitaire de l'hôte, déclenchement de réponse inflammatoire chez l'hôte
Capsule polysaccharidique (<i>ptk</i> et <i>epsA</i>)	Echappement au système immunitaire de l'hôte, croissance dans le sérum
Phospholipase D (A1S_2989)	Résistance au sérum, dissémination bactérienne, survie bactérienne <i>in vivo</i>
Protéine liant les pénicillines 7/8 (<i>plpG</i>)	Biosynthèse de peptidoglycane, stabilité cellulaire, croissance dans le sérum
Vésicules de membrane externe	Transport des facteurs de virulence au cytoplasme de la cellule hôte, transfert de matériel génétique entre les bactéries
Système d'acquisition de fer médiée par Acinetobactine	Fournit le fer nécessaire pour la persistance chez l'hôte, cause de l'apoptose cellulaire

8. Epidémiologie moléculaire d'*A. baumannii*

Des épidémies à *A. baumannii* ayant lieu au sein du même hôpital ou bien entre les hôpitaux au niveau local ou national ont été fréquemment rapportées dans la littérature (Karah et al., 2012; Peleg et al., 2008; Zarrilli et al., 2013). Néanmoins, la notion de clone chez l'espèce *baumannii* n'a été révélée qu'avec l'étude de Lenie Dijkshoorn publiée en 1996 (Dijkshoorn et al., 1996). Des souches d'*A. baumannii* de 14 épidémies ainsi que 17 souches isolées d'infections sporadiques dans différents hôpitaux de pays du nord-ouest de l'Europe ont été comparées par plusieurs méthodes de typage (AFLP, ribotypage, comparaison des profils de protéines de l'enveloppe cellulaire). Les résultats ont montré que les souches épidémiques étaient réparties en deux clones (désignés comme clones Européens I et II), alors que les souches sporadiques étaient plus hétérogènes. Un nouveau clone (désigné comme

clone Européen III) a été délimité en 2004 (Van Dessel et al., 2004). Par la suite, ces clones Européens ont été identifiés dans le monde entier et ont donc été renommés comme clones internationaux (I-III) (Diancourt et al., 2010). Au-delà des clones internationaux, plusieurs autres clones ont été identifiés. Karah et ses collègues ont analysé la structure globale de la population en se basant sur les données de Multilocus sequence typing (MLST) de 496 isolats. Vingt six clones ont été identifiés dont 18 clones internationaux, et 8 clones restreints à l'Europe ou l'Asie. Le clone international II était le clone majeur et était rapporté dans 34 pays en Europe, en Asie, en Afrique, en Australie, aux Etats-Unis et en Amérique du Sud (Karah et al., 2012) (Figure 7 A-C). Le tableau 5 présente les répartitions des souches multirésistantes en fonction du complexe clonal.



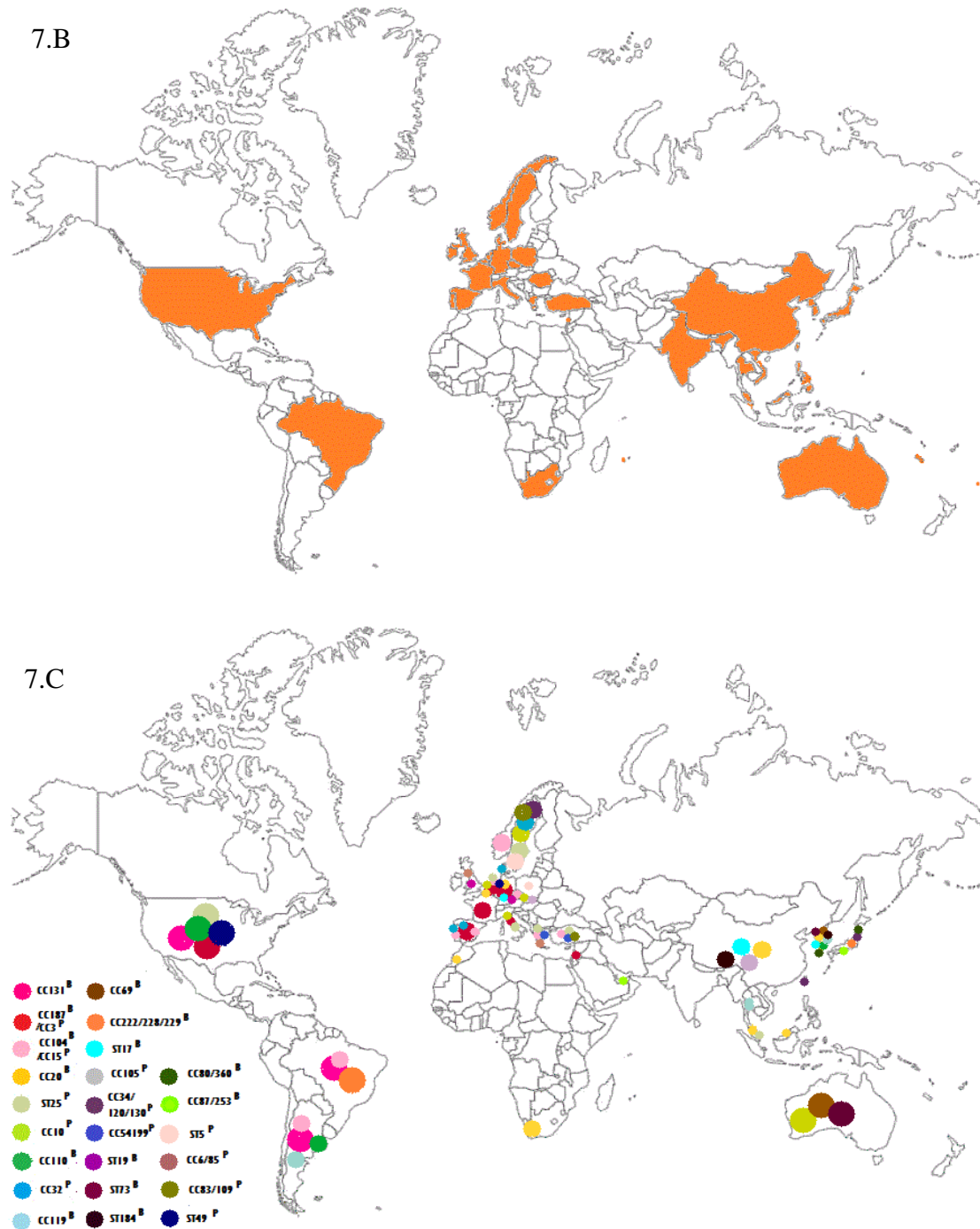


Figure 7 : Cartes représentant la distribution géographique de la population d'*A. baumannii* basée sur les données de deux schémas de MLST analysées par Karah et ses collègues en 2012 (Karah et al., 2012). La Carte A montre la distribution mondiale du complexe clonal CC109^B/CC1^P colorié en jaune. La carte B montre la distribution mondiale du complexe clonal CC92^B/CC2^P colorié en orange. La carte C montre la distribution mondiale de 24 complexes clonaux (chaque complexe clonal a sa couleur spécifique comme mentionné à côté de la carte).

Tableau 5 : Répartition en complexes clonaux des souches multirésistantes d'*A. baumannii*, en fonction des méthodes moléculaires de typage.

Diversilab TM	Pasteur MLST	Bartual MLST	3LST	<i>bla</i> _{OXA-51}	AFLP	Références
WW1	CC1	CC109	SG2	<i>bla</i> _{OXA-69}	I	(Pournaras et al., 2014; Turton et al., 2007; Zarrilli et al., 2013)
WW2	CC2	CC92	SG1	<i>bla</i> _{OXA-66}	II	(Pournaras et al., 2014; Turton et al., 2007; Zarrilli et al., 2013)
WW3	CC3	CC187	SG3	<i>bla</i> _{OXA-71}	III	(Higgins et al., 2012; Pournaras et al., 2014; Turton et al., 2007; Zarrilli et al., 2013)
WW4	CC15	CC103	SG5	<i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{OXA-132}	Cluster A	(Grosso et al., 2011b; Pournaras et al., 2014; Zarrilli et al., 2013)
WW6	ST78	ST196	SG6	<i>bla</i> _{OXA-90}		
WW7	CC25	CC276	SG4	<i>bla</i> _{OXA-64}		(Higgins et al., 2012; Karah et al., 2012; Pournaras et al., 2014; Zarrilli et al., 2013)
WW8	CC10		3/2/8*	<i>bla</i> _{OXA-68} , <i>bla</i> _{OXA-128}	Cluster B	(Pournaras et al., 2014; Zander et al., 2012; Zarrilli et al., 2013)
	CC32	ST120 Pour un isolat avec ST32 ^P		<i>bla</i> _{OXA-100}	cluster 6	(Pournaras et al., 2014; Silva et al., 2010; Zarrilli et al., 2013)
	CC79 CC85	CC113	8/10/11*	<i>bla</i> _{OXA-65} <i>bla</i> _{OXA-94}		(Pournaras et al., 2014; Zarrilli et al., 2013) (Gogou et al., 2011; Pournaras et al., 2014)

SG: sequence group,

* aucun SG n'a été assigné pour CC85 et CC10.

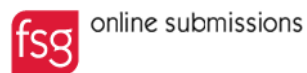
^P pour le schéma de Pasteur

Au Liban, les infections nosocomiales à *A. baumannii* ont augmenté de façon dramatique avec le début des hostilités en 1984. La première épidémie a été décrite en 1992 dans un centre médical (Matar et al., 1992). Une autre épidémie a été observée entre 2004 et 2005 à Saint George University hospital à Beyrouth, 17 souches résistantes aux carbapénèmes appartenant au séquence type ST2 (défini par la méthode basée sur le séquençage de 3 locus, 3-LST de Turton et qui correspond au clone international I (Turton et al., 2007)) ont été isolées avec un taux de mortalité chez les patients de 35%. Une souche sporadique sensible isolée 6 mois avant l'épidémie a été typée et les résultats ont montré qu'elle appartenait au ST3 (qui correspond au clone international III). Le seul mécanisme de résistance aux carbapénèmes chez ces souches était la présence de la carbapénémase OXA-58, portée par un nouveau plasmide dénommé pABIR. Ce plasmide avait une nouvelle structure mosaïque avec 2 origines de répllication, 4 séquences d'insertion (IS) et 28 cadres ouverts de lecture (open reading frame, ORF). Le gène *bla_{OXA-58}* était entouré par les éléments *IS18* et *ISAb₃* aux extrémités 5' et 3' respectivement (Zarrilli et al., 2008). Par ailleurs, Giannouli et ses collègues ont analysé 24 souches isolées de 1999 à 2006 de 18 hôpitaux de Grèce, Italie, Liban et Turquie. Parmi ces souches, 2 souches libanaises isolées en 2004 ont été analysées. Apparemment, ces souches correspondaient au même clone que les souches isolées par Zarrilli (Giannouli et al., 2009). Une autre étude épidémiologique multicentrique a analysé 28 souches isolées entre 1999 et 2009 de 20 hôpitaux des même pays que ceux précédemment cités. Parmi ces 28 souches, 5 souches isolées de patients de deux hôpitaux à Beyrouth en 2004, 2005, 2006 et 2007 ont été étudiées (les deux souches de Zarrilli sont possiblement réintégrées dans cette étude). L'analyse des résultats de MLST a montré la présence de ST20, ST2 et ST3 correspondant aux complexes clonaux I, II et III respectivement (en d'autre terme les clones internationaux I, II et III respectivement). La carbapénémase OXA-58 était le seul mécanisme de résistance aux carbapénèmes retrouvé (Di Popolo et al., 2011). Un autre séquence type, le ST85, portant le gène *bla_{NDM-1}* a été récemment isolé de patients syriens rapatriés sanitaires au Liban (Rafei et al., 2014).

9. Revue sur les méthodes moléculaires actuelles pour le typage épidémiologique d'*A. baumannii*

Les capacités épidémiogènes redoutables de cette bactérie ont suscité le développement de méthodes de typage épidémiologiques efficaces. Au cours de temps, de nombreuses méthodes de typage ont été proposées, allant des méthodes phénotypiques jusqu'aux méthodes moléculaires. Actuellement, l'utilisation de ces méthodes phénotypiques a été considérablement diminuée et remplacée progressivement par les méthodes moléculaires. Dans cette revue, nous présentons les méthodes moléculaires disponibles pour le typage épidémiologique de l'espèce *baumannii*. Chaque méthode a ses avantages et ses inconvénients et le choix d'une méthode de génotypage dépend des objectifs de l'étude. Tous ces paramètres sont discutés dans la revue. Enfin, nous avons essayé de mettre en lumière les questions adressées dans différents contextes épidémiologiques et sur la plupart des méthodes moléculaires utilisées pour réaliser ces objectifs

Revue « Current molecular methods in epidemiological typing of *Acinetobacter baumannii* » acceptée dans Future Microbiology.



Welcome, Marie KEMPF! [Log Out](#)



- Home
- User Guide
- About Us
- Contact Us
- My Details

submissions

Title	Submission Date	Submission Status
Current molecular methods in epidemiological ty...	07/04/2014	Accepted

Submit New

- Future Medicine
- Future Science

**Current molecular methods in epidemiological typing of *Acinetobacter*
*baumannii***

Rayane Rafei^{1,2}, Marie Kempf^{1,3*}, Matthieu Eveillard^{1,3}, Fouad Dabboussi², Monzer Hamze², Marie-Laure Joly-Guillou^{1,3}

¹ L'UNAM Université, Université d'Angers, Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, UPRES EA3142, Institut de Biologie en Santé – IRIS, CHU, 4, rue Larrey, 49933 Angers cedex, France - Phone (33) 2 41 35 50 13 Fax (33) 2 41 35 41 64

² Laboratoire de Santé et environnement, Centre AZM pour la recherche en Biotechnologie et ses applications, Université Libanaise, Tripoli, Liban – Phone (101) 961-6-213383 Fax (105) 961-6-213252

³ Laboratoire de Bactériologie, Institut de Biologie en Santé - PBH, CHU, 4 rue Larrey, 49933 Angers cedex, France

* Corresponding author:

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

Email: makempf@chu-angers.fr

Summary

The emergence of *Acinetobacter baumannii* during the last decades as one important nosocomial pathogen responsible of worldwide intensively documented outbreaks has resulted in a need for effective epidemiological typing methods. Throughout the years, many typing methods for *A. baumannii* epidemiological studies have been proposed from phenotypic to molecular methods. Currently, the use of phenotypic typing methods have declined considerably and been progressively replaced by molecular methods. In this review, we introduce to readers the current molecular methods available for *A. baumannii* typing. Each method has its own advantages and disadvantages and the selection of an appropriate genotyping method depends on studied objectives. This review sheds light on questions in different epidemiological settings and most molecular methods used to fit these objectives.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, molecular typing method, outbreak, epidemiological study.

Introduction

A. baumannii is an opportunistic gram negative bacterium that has been regarded for years as a low grade pathogen. Since the last decades, it has emerged as a clinically relevant pathogen causing a wide range of nosocomial infection outbreaks, community-acquired infections, or war and natural disasters related infections [1]. Its outstanding ability to acquire resistance to all or almost available antimicrobial agents, its innate resistance to desiccation or disinfectants as well as its high ability to persist in clinical environment during long periods are the main features behind its epidemic behavior and thus its successful emergence [2]. Intra-hospital, inter-hospital, or inter-countries *A. baumannii* transmissions are intensively reported in the literature [3–5]. Historically, phenotypic typing methods were used to decipher the clonal nature of *A. baumannii* [6]. With the molecular explosion era, numerous genotypic typing methods are proposed that place the majority of phenotypic methods in the memory of history. There is a wide range of epidemiological methods available for researchers, teams, and organizations specialized in different domains such as medical routine microbiology, infection control manager and surveillance. Thus, they must be vigilant when choosing the method to fit their epidemiological purposes. In this review, we try to give all of the interesting public the most epidemiological typing methods available for *A. baumannii* that

are suitable with their objectives and their questions which are summarized in table 1 and figure 1.

I. Local short-term outbreak investigations

At hospital, medical institution, or any definite local space level where isolation of *A. baumannii* from clinical specimens exceeds the normal rate and where these strains are associated with a particular resistance profile, many questions can arise: is this increasing a real outbreak? If yes, is it a monoclonal or a polyclonal outbreak? Are these strains newly introduced to the hospital or are they endemic and well established old strains? How to differentiate sporadic isolates and epidemic isolates? What is the source or the reservoir of the outbreak? Is it a particular transmission pattern between patients or health care workers? To answer to these questions, typing is required. There are methods of choice applied to investigate outbreaks at local short scale, but other techniques can also be used.

1.1. Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)

Despite the emergence of new approaches based on sequencing, PFGE is still considered as the current gold standard for epidemiological investigations of *A. baumannii* [5]. The genome is cut by a rare-cutting restriction enzyme, producing a few numbers of large fragments which are separated by electrophoresis technique changing periodically the direction of an electric field, and allowing the resolution of large fragments up to 1,000 Kb [7]. The choice of restriction enzymes is a key factor in PFGE process and has a critical impact that influences quality of results, analysis and reproducibility [8]. The most widely used restriction enzymes are *ApaI* [9–13], then *SmaI* [14]. In general, PFGE results with *SmaI* and *ApaI* are concordant, but *SmaI* shows a controversial typeability and a discriminatory power slightly inferior to that with *ApaI* [15,16]. Guidelines based on comparison of band position have been proposed by Tenover [17] and the European Study Group on Epidemiological Markers [18] to decipher, infer and conclude the genomic relatedness between strains. The PFGE resulting patterns are usually analyzed by computer-assisted analysis. The most commonly used similarity cut-off in the prediction of *A. baumannii* putative clones is >80% (which indicated 4-6 differences in the gels with average of 20 bands per pattern) [9,12].

The high discriminatory power of PFGE makes it the technique of choice for typing *A. baumannii* outbreaks that occur in a well-defined spatial and temporal span interval [19].

PFGE has also proven its strength in retrospective local studies [20], in national [12,13,21,22], and international surveillance of multi-drug resistant (MDR) *A. baumannii* [23], as well as in identification of unsuspected clones [9]. In fact, genetic events that occurred from generation to another can complicate the PFGE-generated pattern and therefore PFGE cannot be considered as a method of choice for large scale studies [24]. Also, PFGE suffers from several limitations: long time of intensive work (2-4 days), non typeability of some strains. But, the main gap is the lack of reliable interlaboratory reproducibility due to the high sensitivity of electrophoresis-based methods on electrophoresis conditions and DNA preparations.

1.2. Random amplified polymorphic DNA (RAPD)

Random amplified polymorphic DNA, also designated as arbitrary primer polymerase chain reaction is a PCR method based on random amplification of fragments by arbitrary primers at lower stringency conditions [7]. This makes it a simple used method for epidemiological typing of bacteria. The correlation between PFGE and RAPD [25] indicates that the last can provide a useful information for epidemiological investigations of *A. baumannii* outbreaks. RAPD has been largely applied to investigate clonal spread of epidemic *A. baumannii* strains in hospitals [26,27]. However, at large scale, a number of problems and difficulties hinder its use as a 'Library' method [18]. These problems can be summarized by the lack of intra- but mostly inter-reproducibility, as a result of the lack of standardized reagents, equipment, PCR conditions, protocols between laboratories and therefore incapacity to compare the banding patterns of a large collection of isolates examined on different gels at different times and at different locations.

1.3. Repetitive sequencing-based (rep)-PCR

Rep-PCR is a PCR-based method that exploits the bacterial genome dispersion of repetitive sequences. It examines the distance of DNA fragments located between these repetitive sequences by using outwardly primers designed to anneal under relatively stringent amplification conditions on these repetitions [28]. The rapidity of rep-PCR, flexibility, accessibility, make its genomic fingerprints a successful molecular epidemiology tool to study and clonally screen many epidemic *A. baumannii* strains [15,29,30]. Rep-PCR, as well as other techniques based on PCR, suffers from interpretation problem of banding pattern because of the paucity of a clear biological explanation. Besides, the lack of reproducibility within and between laboratories and consequently non exchangeable data are the main

obstacles affecting their general application [7]. Recently, rep-PCR was semi-automated and marketed under the name of DiversiLab (DiversiLab™, bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). It allowed rep-PCR to access to a new field of applications, never been used by the manual rep-PCR, and to get new achievements and success in studying *A. baumannii* epidemiology. The main advantages of this system lie on its high discriminatory power, its high reproducibility intra and interlaboratory, and its ability of building databases that can store epidemiological data and exchange them between different users. Although, a minor discordance between DiversiLab and PFGE in typing *A. baumannii* have been published [31]. The identification of 8 international clones (WW1, WW2, WW3, WW4,...WW8) is one of the particular achievements of DiversiLab [32]. It is considered as an important tool that can be used as a first line in molecular investigations of local epidemiology [33] as well as for monitoring and national surveillance purposes [34,35].

II. Fine scale typing

Despite the strength of the most aforementioned typing methods, they still lack the sufficient resolution to be enough discriminated inside the very homogenous clones of *A. baumannii*. Indeed, many questions can arise: How can we differentiate these clones into more-sub-clones? How can we track transmissions and cross-infections during a local outbreak? How can we serve of typing methods to identify resistance genes?, virulence factors?, effective therapeutic regimens and infection control strategies? Several promising approaches are available to perform a fine typing methodology within *A. baumannii* clones.

2.1. Multiple-Locus Variable number of tandem repeat Analysis (MLVA)

MLVA is a PCR-based method that exploits the number of repetitions at multiple loci for a class of repetitive DNA known as variable number of tandem repeats (VNTR) [36]. Its power results from the following characteristics: portability, high resolution with a great availability and adaptation to automation, and high discriminatory power that make it a promising technique in *A. baumannii* strain typing [37]. As any typing method, MLVA suffers from several shortcomings. Thus, some loci are characterized by a rapid evolution and high mutation rates. So, to get reliable clustering, it is necessary to combine markers with rapid evolution that have useful discrimination in short defined outbreak settings with markers with slow evolution suitable for long studies [37]. Overall, there are currently 10 identified VNTR loci with sufficient discriminatory power for typing and 4 MLVA proposed schemes based on different selections of these loci [37–40].

2.2. Whole genome sequencing (WGS) and single nucleotide polymorphism (SNP) determination

With the introduction of new high-throughput sequencing technologies, fully complete and draft genome sequences for several *A. baumannii* strains including successful international lineages are now available. Unlike traditional typing methods, whole genome sequencing (WGS) approaches decipher the total information present in bacterial genome and thus they can address all epidemiological issues ranging from fine epidemiological studies [41], to local [42,43] and global studies until the phylogenetic and population structure studies [43]. Within a small scale outbreak, WGS approaches can resolve genetic differences between very closely related strains and can enlighten unclear routes of transmission between patients. Lewis *et al.*, [41] applied WGS on 6 MDR strains to understand the chains of transmission from military casualties to civilians during a hospital outbreak in the UK. All these isolates appeared indistinguishable by PFGE and VNTR analysis. Using a conservative approach considering only well validated SNP, high-quality informative SNP associated with three polymorphic sites (AB57_2551, AB57_2001, AB57_1823) could differentiate between alternative epidemiological scenarios. Furthermore, SNP determination has been considered as a useful tool to define relatedness between highly homogenous pathogens. The main challenge is the discovery and the selection of the most significant mutations that reflect finely the diversity of population [18]. Otherwise, other studies must be done to analyze other polymorphic sites and their occurrence within *A. baumannii* clones.

At strain level, beyond SNP and INDEL (insertion-deletion) approaches, WGS analysis provides opportunities to explore and identify useful gene contents within bacterial genome like antimicrobial resistance determinants including resistance islands (discussed below), virulence genes and additional informative genome sequences which can also serve for fine epidemiological ends or to explain some exhibited phenotypes. Adams *et al.*, [44] analyzed the genome of 6 closely related strains belonging to international clonal 1, including 4 originating from the same hospital outbreak. Genomewide analysis revealed extensive diversity in resistance genotype. Each strain had its own resistance gene repertoire with unique combinations of resistance genes associated with mobile genetic elements (insertion sequences, plasmids and resistance islands). This poor correlation between genetic relatedness and antimicrobial resistance machinery highlights the limitations of current typing methods to control changes in resistance genotypes. Interestingly, WGS was used also to define the set of genes in core and accessory genomes. Di Nocera *et al.*, [45] compared the whole genome

organization of 3 epidemic strains assigned to ST2, ST25 and ST78, most common genotypes involved in Mediterranean hospital outbreaks and the genome of 4 fully sequenced MDR *A. baumannii* strains assigned to ST1, ST2 and ST77. Comparative genome analysis define 3068 coding regions as conserved components and 63 genomic islands (4-126 Kb) as accessory components present in some strains or missed or replaced by other non-homologous DNA sequences in others. Some islands are involved in drug or metal resistance, surface components synthesis, metabolic pathways and others are prophage-like elements. The distribution of 18 genomic islands in well characterized collection of epidemic strains showed that some islands are specific to certain genotypes and thus can be useful for *A. baumannii* epidemiology. In order to understand the origin of a MDR phenotype in *A. baumannii*, Adams *et al.*, [46] compared the entire genome sequences of 3 MDR strains and 3 susceptible strains. The acquisition of resistance determinants throughout the genome was found the major contributor to a MDR phenotype where efflux pumps were the least significant resistance determinants compared to inactivating enzymes. Resistance islands participated significantly but were not universal contributor to a MDR phenotype. Additionally, to determine if a certain tissue tropism is associated with specific genome sequences, Sahl *et al.*, [47] analyzed the genomes of three unrelated strains, two of those had a colonization phenotype (wound, peri-anal) and the other had an invasion phenotype (blood). Specific genomic regions are identified in each phenotype, but further screen by PCR assays on 74 isolates showed that these regions are not restricted to a specific phenotype.

Furthermore, WGS studies provide new insights to understand nosocomial outbreak dynamics in hospital environments: how a pathogen evolves within the hospital and even within the same patient? What is the origin, the history and the pattern of transmission of an outbreak? What are the drivers of strain evolution? Is it lateral gene transfer, recombination or mutation mechanism? how targeted antimicrobial resistance genes circulate and flow during outbreak? Two pioneering studies [42,43] have increased our understanding about *A. baumannii* evolution and its emergence during nosocomial outbreaks. Better understanding of a pathogen evolution may improve diagnostics, treatment, infection control and prevention efforts. Snitkin *et al.*, [42] used genomic study to elucidate the origin of a polyclonal outbreak. WGS analysis of 3 dominant outbreak strain pulsotypes suggested that these strains, despite they are belonged to the same international clone 2, diverged before their arrival to hospital and this diversification was mediated by homologous recombination across 20% of their genomes. The recombinant regions were associated with either the loss or

swapping out of genes encoding proteins exposed to the cell surface or involved in the synthesis of extracellular molecules. Wright *et al.*, [43] investigated *A. baumannii* population dynamics in hospital environments. He compared the whole genome sequences of 49 strains recovered over 1 year from one United States hospital system. Gene content analysis revealed extensive genetic diversity in such manner that each strain was unique despite that most strains belonged to international clone 2 and a diverse pool of circulating strains was shown. Moreover, genomic analysis showed a complex and redundant resistance repertoire with evidence of lateral gene transfer, recombination, mutation and gene loss. With the observed limited capability of current typing methods and antimicrobial susceptibility profile, authors emphasized the need of genomic analysis and molecular diagnostics testing to determine resistance genotype.

Finally, this ultimate resolution can represent WGS as a future gold standard typing method for bacteria. Other genomic studies are also required to elucidate *A. baumannii* population at local and global scale.

2.3. Accessory genomes

WGS have introduced new concepts as pan-genome, core genome and accessory or dispensable genome [48] that led us to get more ideas about lifestyle, population structure, virulence, and diversity of bacterial species. As we have mentioned above, *A. baumannii* accessory genome is diverse and contains a significant number of isolate specific genes (or singletons) contributing to consider the bacterium as an open pan-genome [48]. Accessory genomes may give useful information in epidemiological contexts. The occurrence of specific and quite unusual resistance traits may be used as a tool for tracing a specific clone. Performing PCR for a particular ESBL or carbapenemase may be constitutive as for tracing VEB-1-producing *A. baumannii* strain at hospital [49] and at national scale [50]. For instance, some authors have benefited from the extensive variability of accessory genome like integrons [51], resistance genes [52], resistance islands [53,54], polysaccharide gene clusters [55] or selected accessory genes [56] to perform fine epidemiological typing. Although, the usefulness of the last approach in tracing clones is a controversial issue, because evidences of recombination and lateral gene transfer in *A. baumannii* have been demonstrated and some different clones may have the same resistance determinants [43]. Thus, this approach can be useful for characterization of clones rather than for clones tracking.

Resistance islands of *A. baumannii* have been largely characterized by WGS approaches [43,45,46]. Several resistance islands have been identified where the majority has been found integrated in a specific locus (*comM* gene) [2]. Resistance island structure analysis revealed backbone transposon differences between international clone 1 and 2 [2,53,54]. Therefore, structure and content analysis by a long range PCR of *comM* gene locus followed by DNA sequencing has been proposed as a resistance island typing [5]. Recently, the occurrence of 108bp deletion within resistance island structure was proposed as additional marker to delineate lineages within the international clone 1 [53].

2.4. A. baumannii - PCR based replicon typing [AB-PBRT] method

In the early of 1990, as any other organism, *Acinetobacter* intrinsic plasmids formed the crude matter for the first molecular epidemiological typing technique known as plasmid typing [57]. But several problems hindered its use as a single typing technique which was replaced currently by other methods. The re-interest towards *Acinetobacter* plasmids has been growing up during the last years especially after the discovery of their major role in resistance to carbapenems [58] and the characterization of new plasmid markers like pAN1, a cryptic plasmid of 8.7 kb present in most of strains of the International clone I [59]. A novel AB-PBRT method has been proposed as an easy and cheap multifunctional tool to improve knowledge on circulating plasmids in *A. baumannii*, to trace a resistance gene carried by a specific plasmid or to use plasmids as additional markers during epidemiological investigations [60].

III- Large scale epidemiological studies

The study and characterization of bacterial population structure of a relevant pathogen is crucial since it improves our understanding of its evolutionary history, phylogenetic relationships, genetic diversity, and circulating clones causing disease. Also, it can impact our choice of an effective epidemiological method at local and large scale and our design of new public health policies facing the bacterial evolution.

The first demonstration of clonal nature of *A. baumannii* can be referred to the work of Dijkshoorn *et al.*, 1996 [61] who identified two clones by using AFLP and ribotyping combined with phenotypic methods, later named as European clones (currently called international clone 1 and 2) [62] disseminated in northwestern European hospitals. After that, a third European clone has been described [63]. The introduction of MLST gave opportunity

to detect additional clones, draw new structuration of *Acinetobacter* population and give a real picture of circulating bacterial clones over a time, strain replacement or epidemiological behavior. Otherwise, with the huge methods used to delineate *A. baumannii* population, two major issues can arise: first, the need of a careful coordination and validation between all tested population structure methods and second the great need of an appropriate population collection representing strains at different conditions and ecological niches other than clinical specimens.

For these studies, automated, reproducible, network analysis, and international database based methods are the most efficient [18]. For *A. baumannii*, several methods are tested for global investigations as sequence-based methods (SLST, 3LST, MLST), AFLP, ribotyping or MLVA.

3.1. Ribotyping

Ribotyping is a RFLP variant that deciphers genetic polymorphism within the genomic sequence coding 16S and 23S rRNA genes and their DNA flanking regions [64]. It appears as an important and reproducible tool to study *Acinetobacter* diversity and molecular epidemiology, but its relatively low discriminatory power makes it most suitable for population structure studies rather than local epidemic analysis [6].

3.2. Amplified fragment length polymorphism (AFLP)

AFLP is a DNA fingerprinting technique for any DNA regardless to its origin and complexity. AFLP has been considered, as PFGE, the gold standard for molecular epidemiology of *Acinetobacter*. It appeared very useful for identification of *Acinetobacter* species, delimitation of successful *A. baumannii* clones, and detection of epidemic strains. Several protocols have been proposed but the Leiden University Medical Center (LUMC) protocol was the most frequently used. It uses *EcoRI* and *MseI* as restriction enzymes, digestion and ligation reactions are done in a single step, followed by amplification with Cy-5 labeled *EcoRI*-A primer and *MseI*-C primers. The images resulting from amplified fragments on sequencing machine are analyzed for cluster analysis [65,66]. It leads to the formation of a large worldwide database that harbors up of 2000 AFLP fingerprints. Using the clone definition level (80% as a similarity cut-off), AFLP could identify different emerging clones as European clones [59,63] and other novel clones [9,62,67]. Using the strain definition level (90% as a similarity cut-off), AFLP appeared very important in investigating outbreaks at

small scale and the detection of putative epidemic strains [67]. Overall, the high AFLP's discriminatory power and its deep resolution of genomic relatedness at different levels (species, clone and strain) make it a powerful method to at the same time identify, study *Acinetobacter* epidemiology at local scale as PFGE, and at large scale in longitudinal analysis, surveillance, monitoring and population structure studies as MLST.

3.3. Sequence-based methods

3.3.1- Single-Locus Sequence-based typing

adeB typing: The *adeB* gene forms part of a cluster of genes coding for an AdeABC efflux system (*Acinetobacter* drug efflux) which were the first described efflux belonging to RND (resistance-nodulation-cell division) efflux pump family in *A. baumannii* [68]. The internal fragment analysis of *adeB* gene (850bp) in a collection of 50 multidrug resistant strains revealed the presence of 11 sequence types (ST). This delimitation correlated well with the international clonal clustering (clone I, II, III has the same ST I, II, III respectively) [69]. In addition, a correlation was found between MLST and *adeB* sequence typing which can give a global epidemiology overview [70]. However, this typing technique cannot be widely applied. Indeed, AdeABC operon is present in 80% only (from 53% to 97%) of MDR *A. baumannii* strains [68] and it is not detected in several environmental strains [69].

rpoB typing: the *rpoB* gene encoding the beta subunit of RNA polymerase presents a future candidate gene for taxonomic, phylogenetic studies as well as for species identification especially for the differentiation between closely related species [71]. La Scola *et al.*, [71] validated its use for identification of different species belonging to *Acinetobacter* genus. He showed the presence of four variable regions: two regions (Zone 1 of 350 pb and Zone 2 of 450 bp) within the *rpoB* gene in addition 2 flanking regions (*rplL-rpoB* and *rpoB-rpoC*) which each has the sufficient polymorphism for rapid identification of most *Acinetobacter* species. Although this gene is not currently regarded as a tool for epidemiological investigation, some studies searched to evaluate its ability in *Acinetobacter* typing during an outbreak [72]. Villalón *et al.*, [21] has tested the use of *rpoB* partial sequence (zone II) as a marker for early detection of an epidemic strain. Five *rpoB* sequence types were detected which their distribution correlated well with PFGE types (each clone has a *rpoB* sequence type) and MLST results. Nevertheless, PFGE remains a more discriminating technique compared to *rpoB* sequencing.

***bla*_{OXA-51-like} sequence-based typing:** *bla*_{OXA-51-like}, beta-lactamases of class D, are a set of intrinsic, ubiquitous, chromosomal genes that naturally occurred in *A. baumannii* [58]. Since this first detection, several variants were detected contributing to the formation of one of the largest β -lactamase group which harbor until now 95 identified enzymes [73]. The most important application is the molecular identification of *A. baumannii* at species level by simply detecting *bla*_{OXA-51} gene by PCR [74]. As well, several studies investigated the usefulness of *bla*_{OXA-51} as a single locus in typing. Evans *et al.*, [75] analyzed 60 *A. baumannii* isolates collected from several worldwide hospitals by PFGE techniques, 3LST and *bla*_{OXA-51-like} sequencing. The majority of isolates belonging to clones I and II such that the EU clone I encoded the enzyme OXA-69, EU clone II OXA-66 and EU clone III OXA-71. A map construction showing the relationships between the 37 known variants of OXA-51 revealed the presence of two closely related groups whose ancestors of each group is one of the enzymes OXA-69 or OXA-66, confirming the idea that the EU clones I and II are well established clones with a minimal variation in their virulence genes. A lack of correlation between PFGE and those of 3LST and sequencing-based gene *bla*_{OXA-51} can be explained by the diverse nature of tested isolates and the ability of PFGE to detect genome micro-variations induced by the presence of mobile elements as *ISAbal*. Hamouda *et al.*, 2010 [24] evaluated the use of *bla*_{OXA-51} gene as a typing scheme. The Bartual's MLST data correlated well with *bla*_{OXA-51} sequencing; otherwise, the PFGE results are more discriminating relative to the two previous schemes. It is proposed that *A. baumannii* epidemiological studies may involve an initial screening of *bla*_{OXA-51-like} alleles to identify whether an isolate belongs to one of the three EU clones, followed by MLST analysis, whereas PFGE is reserved for fine epidemiological studies. Zander *et al.*, 2012 [76] found a tight correlation between *bla*_{OXA-51} genes and the 8 worldwide international clones identified by rep-PCR (DiversiLab), and a possibility to use it as a marker to identify them. The authors suggest that this correlation results from the co-evolution of *bla*_{OXA-51} with *A. baumannii* genomes while the little discrepancies observed between the 2 schemes may be due to the recombination effects on repetitive sequences. Pournaras *et al.*, 2014 [77] evaluated the *bla*_{OXA-51-like} sequence-based typing for its ability to identify correctly sequence types (STs) in 585 multidrug-resistant *A. baumannii* clinical strains in comparison with the Pasteur's MLST as a reference method and 3-locus sequence typing (3-LST). All isolates were typed correctly and assigned to their corresponding STs and to their clonal complexes (CCs). 3-LST was appeared unable to classify all isolates. As being rapid, cheap, and an easier method, the single-locus *bla*_{OXA-51-like}

sequence-based typing seems a very useful technique to give a global overview and to assign *A. baumannii* to appropriate clones.

recA sequencing: *recA* is a housekeeping gene so essential to maintain and diversify genetic bacterial material [78]. It was proved his usefulness in *Acinetobacter* identification at species level [78]. Beside identification, it is one of the seven genes in both MLSTs schemes (Pasteur and Bartual) proposed for *Acinetobacter* (see MLST for further details). The sequencing of 336 pb fragment has been used as a single typing method to genotype body louse *A. baumannii* isolates [79] and 12 genotypes have been described until now [80]. Further studies will be done to validate its usefulness for clinical isolates especially international isolates.

3.3.2. Trilocus Sequence Typing (3-LST)

The accumulated variation present in genes under selective pressure can be very meaningful and gives more useful information in outbreak investigation than that present in selectively neutral housekeeping genes exploited by MLST. An approach based on sequencing of 3 highly polymorphic loci (14 nucleotides are the minimum difference between 2 alleles in any locus, except the closely related alleles): *ompA* (outer membrane protein A), *csuE* (chaperone-subunit usher E, part of polycistronic operon involved in pili assembly) and *bla_{OXA-51-like}* is proposed for clonal identification of *A. baumannii* strains [81]. The isolates belonging to the same group have the same allele combination of the 3 loci and are characterized by a sequence type (ST). Turton delineated his isolates collected from 5 countries into 3 sequence groups (SG) 1-3 that corresponds well to the previously identified international clones. In such manner, Sequence Groups 1, 2, 3 correspond respectively to international clone II, I, and III [81]. Others sequence groups have been identified as SG4, SG5 [82], SG6 [83], and SG7. The annotation of novel sequences is performed in the following site (<http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/AB/home.php>). To overcome the limitation of sequencing equipment availability in clinical laboratory, a PCR multiplex has been elaborated for rapid identification of the three international lineages. It consists of 2 groups of PCR multiplex (group 1 and 2), each group of PCR has its own primers amplifying selectively the 3 pre-cited loci corresponding to their sequence group. Thus, international group II or PCR-based group 1 gives only amplified fragments at the 3 loci in group 1 PCR but not in group 2 PCR, whereas international group I or PCR-based group 2 gives only fragments at the 3 loci present in group 2 PCR but not 1. For international clone III, or PCR-based group 3 yields only *csuE* and *bla_{OXA-51}* amplicons in group 1 PCR, and *ompA* in group 2

PCR [81]. Different combinations of amplicons have been seen with other strains not belonging to international groups and let to identify 'additional' PCR-based groups (G4-7) [25] and 'putative' clones (G8-14) [22,83–86] to look the different combinations, refer to the review of Karah *et al.*, [4]. These approaches are very useful for preliminary typing [83] and for assigning an isolate to one of well-established international clones or new emerging clones. Overall, the obtained results are concordant with other typing techniques, especially with MLST [22,83,86] but it still has a lower discriminatory power than PFGE [25,75,81] and therefore it is inappropriate for epidemiological studies at fine scale.

3.3.3. Multilocus Sequence Typing (MLST)

MLST is one of the most successful and widely accepted typing techniques used to study clonality and population structure for a broad spectrum of pathogens. It assesses the neutral genetic variation that accumulates slowly within a population by targeting house-keeping genes involved in essential metabolic process. In general in a MLST scheme, internal fragments of 7 genes are sequenced; each sequence of a gene is considered as an allele type. The combination of allele types for each gene present in a MLST scheme defines a sequence type (ST) [87]. For *A. baumannii*; 2 MLST schemes have been developed. The first has been proposed by Bartual *et al.*, [88] (assigned from now as MLST^B) which is based on sequence analysis of internal conserved regions of 7 genes (citrate synthase (*gltA*), DNA gyrase subunit B (*gyrB*), glucose dehydrogenase B (*gdhB*), homologous recombination factor (*recA*), 60-kDa chaperonin (*cpn60*), glucose-6-phosphate isomerase (*gpi*) and RNA polymerase sigma factor (*rpoD*)). A good correlation has been found between MLST^B, PFGE and AFLP. This scheme is present actually on oxford Database (<http://pubmlst.org/abaumannii/>). It should be noted that in February 2010, this Database undergone large modifications resulting on alleles, sequence types and clonal complexes designation changes. The second scheme has been proposed by Diancourt *et al.*, [62] (assigned from now as MLST^P 'P for Pasteur') which is based on sequencing of internal portions of 7 genes where 3 are common to MLST^B (*cpn60*, *fusA* (elongation factor EF-G), *gltA*, *pyrG* (CTP synthase), *recA*, *rplB* (50S ribosomal protein L2) and *rpoB* (RNA polymerase subunit B)). Its database is present in MLST Pasteur web site (<http://www.pasteur.fr/mlst>). After their recent implementation, large numbers of publications are used MLST^P or MLST^B to get an idea about *A. baumannii* population structure and to categorize it into global lineages. Otherwise, there are limited number of publications using both schemes but usually showing a concordance between them [12,22,84]. Many studies highlight the un-usefulness of many loci in MLST^B. Hamouda *et al.*, [24] pointed out that

gyrB and *gpi* are not good candidates loci for MLST analysis due to the observed incongruence in the topologies of their phylogenetic trees compared with those generated with the five other MLST loci and their possible submission to a horizontal gene transfer. Park *et al.*, [89] reported clustering inconsistencies between phylogenetic groups of colistin resistant *Acinetobacter* spp in Korea especially in *gdhB* and *gpi* phylogenetic trees. Snitkin *et al.*, [42] demonstrated the occurrence of a widespread recombination in *A. baumannii* that can affect MLST loci, especially MLST^B. He recommended the need to take into account the recombination bias when interpreting the MLST results. Despite these previous studies, others proved the high discriminatory power of MLST^B relative to MLST^P and the possible association between *gyrB* and *gpi* mutations with genetic determinants of carbapenem resistance [90].

MLST has many advantages that make it the current gold standard for population structure investigations. On one hand, its portability as it is able to generate highly standardized, reproducible data that can be stored in a database; on the other hand, its high discriminatory power in long-term global studies as surveillance and monitoring studies and its capacity to delineate lineages to known and unknown circulating clones. The secret of this powerful discriminatory arises from the slow genetic variation targeted (as we mentioned earlier), but that does not make it suitable for a small scale and fine typing studies aimed to distinguish between closely related strains [87]. Comparing MLST with other sequence based techniques, a general agreement exists, but it still has a high discriminatory power relative to *adeB* typing [70], *rpoB* typing [21], *bla*_{OXA-51} typing [24], and 3-LST [77]. The main purpose of MLST, as we reported above, is drawing population structure of a pathogen by identification of clones (set of isolates with the same ST) and clonal complexes (set of isolates with closely related ST) [87]. The number of available population structure studies [4,5,62] is very limited. As MLST databases are continuously expanded, others studies are absolutely required.

3.4. Multilocus polymerase Chain Reaction/Electrospray ionization mass spectrometry (PCR/ESI-MS)

This technique is considered as a MLST variant which follows its same principle, but unlike it, the amplicon analysis is performed by ESI-MS instead of traditional sequencing [91]. It is available as an automated platform initially called Ibis T5000 Universal Biosensor designed by Ibis Biosciences System (Carlsbad, CA, USA) and recently as plexID designed

by Abbott Molecular (Des Plaines, IL, USA) [92]. This system has been proposed for *Acinetobacter* genus in a pilot study [91] using isolates collected from infected or colonized soldiers and civilians treated in military hospitals after Iraq operations. The usefulness of this method was confirmed by its ability to give concordant results with PFGE [72,93]. Compared with DiversiLab, some publications prove the high discriminatory power of PCR/ESI-MS power relative to DiversiLab [72,93]. Whereas, when Decker *et al.*, [35] studied the temporal evolution of *A. baumannii* over 11 years in 2 urban centers in Ohio, USA using the two automated systems pre-mentioned, he found that DiversiLab is more discriminating than PCR/ESI-MS and that the combined approach of this 2 typing methods is very useful for regional epidemic study. As automated, PCR/ESI-MS has many advantages: its speed, it can provide quick results in 6 to 8 hours; its ability for examination of large number of samples which makes it very suitable for monitoring studies at large scale; its multi-usage as having an ability to identify, genotype, delineate population structure and determine antibiotic resistance.

Future perspective

We have reported in this review the wide number of applied methods for *Acinetobacter baumannii* molecular typing. Yet, the world is moving towards automated, reproducible, high throughput and computer-assisted methods. Thus, data can be stored in databases, exchanged, and compared between countries. DNA sequencing are more convenient with these aforementioned criteria, otherwise the use of band-based methods will be increasingly reduced. Nowadays, the availability of next generation sequencing in laboratory is still limited, but the WGS approaches will be the gold standard and the main genotyping methods in the next future. No doubt, this last method will open certainly new fields on typing methods to select more useful locus and successful and quick schemes as SNP to type our bacteria. Furthermore, we can't forget that mass spectrometry as MALDI-tof (phenotypic typing methods) are a promising typing method [94]. Finally, authors recommend the presence of networks that try to collect all epidemiological data of *A. baumannii* outbreaks, to validate available typing methods, to coordinate and harmonize output typing data and to define standard nomination for emerging clones.

Executive summary

Importance of *A. baumannii*

- A clinical relevant pathogen causing a wide range of infections.
- Emergence of multidrug resistant strains to almost or all antimicrobials agents.
- Responsible of intensively documented intra-hospital, inter-hospital or inter-countries transmissions.

Goals for genotyping *A. baumannii*

- Identification of epidemic strain(s) and sporadic strain(s) during outbreak.
- Strain tracking to identify transmissions scenarios, cross-infections, outbreak sources and vectors and to implement effective control measures.
- Identification of circulating clones, virulent clones and temporal pattern of strain replacement to implement global effective majors.
- Understanding population structure and description of evolutionary history.

Scales in genotyping *A. baumannii*

- Investigation of set of suspected strains collected at short span interval and definite local space (local scale investigation).
- Investigation of set of highly homogenous clones or very closely related strains collected at local or large scale (fine scale typing).
- Investigation of large number of strains collected at different moments and/or different conditions and/or different geographic space (large scale investigation and population structure studies).

Methods for typing *A. baumannii* at local scale

- Pulsed field gel electrophoresis.
- Amplified fragment length polymorphism with 90% as a cut-off.
- Repetitive sequencing-based PCR.

- Random amplified polymorphic DNA.

Methods for typing *A. baumannii* at fine scale

- Multiple-Locus Variable number of tandem repeat Analysis.
- Whole genome sequencing.
- Single nucleotide polymorphism determination.
- Accessory genome-based methods.
- *A. baumannii*-PCR based replicon typing method.

Methods for typing *A. baumannii* at large scale and population structure studies

- Amplified fragment length polymorphism with 80% as a cut-off.
- Single-locus sequence-based typing (*bla*_{OXA-51}, *adeB*, *recA*..).
- Trilocus sequence typing.
- Multilocus sequence typing.
- Multilocus polymerase chain reaction/Electrospray ionization mass spectrometry.
- Ribotyping.

References

Papers of special notes have been highlighted as:

* =of interest

**= of considerable interest

1. Eveillard M, Kempf M, Belmonte O, Pailhoriès H, Joly-Guillou ML. Reservoirs of *Acinetobacter baumannii* outside the hospital and potential involvement in emerging human community-acquired infections. *Int. J. Infect. Dis.* 17, e802–e805 (2013).

2. Roca I, Espinal P, Vila-Farrés X, Vila J. The *Acinetobacter baumannii* oxymoron: commensal hospital dweller turned pan-drug-resistant menace. *Front. Microbiol.* 3 (2012).
3. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 21(3), 538 (2008).
4. 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.* 15(4), 237–247 (2012).

**Analysis of global population structure of *A. baumannii* on selected subset of isolates with focus on the presence of resistance mechanisms.

5. Zarrilli R, Pournaras S, Giannouli M, Tsakris A. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 41(1), 11–19 (2013).

**overview of the evolution of current genotyping methods used in *A. baumannii*, and a global epidemiology of both clonal lineages and carbapenem resistance in clinical strains.

6. Dijkshoorn L. Typing *Acinetobacter* Strains: Applications and methods. In: *Acinetobacter biology and pathogenesis*. Bergogne-Bérézin E, Friedman H, Bendinelli M (Eds.). Springer, New York, US, 85–104 (2008).
7. Pukall R. DNA fingerprinting techniques applied to the identification, taxonomy and community analysis of prokaryotes. In: *Molecular identification, systematics, and population structure of prokaryotes*. Stackebrandt E (Ed.). Springer, Verlag Berlin Heidelberg, DE, 51–71 (2006).
8. Chang KM, Huang WC, Chiou CS, Shen GH, Huang CC, Wen FS. Suitable restriction enzyme for standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocol and interlaboratory comparison of *Acinetobacter baumannii*. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 46(3), 195–201 (2013).

*Evaluation of most suitable restriction enzymes with rare cutting sites for a pulsed field gel electrophoresis protocol for *A. baumannii*.

9. Turton JF, Kaufmann ME, Warner M, *et al.* A prevalent, multiresistant clone of *Acinetobacter baumannii* in Southeast England. *J. Hosp. Infect.* 58(3), 170–179 (2004).
10. Seifert H, Dolzani L, Bressan R, *et al.* Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* 43(9), 4328–4335 (2005).

*Development of standard and inter-laboratory reproducible protocol for pulsed-field gel electrophoresis of *A. baumannii* with *ApaI* as a restriction enzyme.

11. Durmaz R, Otlu B, Koksall F, *et al.* The optimization of a rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for the typing of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *Jpn. J. Infect. Dis.* 62(5), 372–377 (2009).
12. Adams-Haduch JM, Onuoha EO, Bogdanovich T, *et al.* Molecular epidemiology of carbapenem-nonsusceptible *Acinetobacter baumannii* in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 49(11), 3849–3854 (2011).
13. Gogou V, Pournaras S, Giannouli M, *et al.* Evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages: a 10 year study in Greece (2000-09). *J. Antimicrob. Chemother.* 66(12), 2767–2772 (2011).
14. Park YS, Lee H, Lee KS, *et al.* Extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: risk factors for acquisition and prevalent OXA-type carbapenemases-a multicentre study. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 36(5), 430–435 (2010).
15. Liu PY, Wu WL. Use of different PCR-based DNA fingerprinting techniques and pulsed-field gel electrophoresis to investigate the epidemiology of *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 29(1), 19–28 (1997).
16. Lambiase A, Piazza O, Rossano F, Del Pezzo M, Tufano R, Catania MR. Persistence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in an Italian intensive care unit during a forty-six month study period. *New Microbiol.* 35(2), 199–206 (2012).

17. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33(9), 2233–2239 (1995).
18. Van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, *et al.* Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.* 13, 1–46 (2007).

**An update of guidelines and criteria for evaluation, application and results interpretation of bacterial typing methods.

19. Cetin ES, Durmaz R, Tetik T, Oflu B, Kaya S, Çalışkan A. Epidemiologic characterization of nosocomial *Acinetobacter baumannii* infections in a Turkish university hospital by pulsed-field gel electrophoresis. *Am. J. Infect. Control.* 37(1), 56–64 (2009).
20. Runnegar N, Sidjabat H, Goh HM, Nimmo GR, Schembri MA, Paterson DL. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a single institution over a 10-year period. *J. Clin. Microbiol.* 48(11), 4051–4056 (2010).
21. 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.* 49(3), 875–882 (2011).
22. Grosso F, Carvalho KR, Quinteira S, *et al.* OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii*: a new hotspot of diversity in Rio De Janeiro? *J. Antimicrob. Chemother.* 66(1), 62–65 (2011).
23. Mendes RE, Bell JM, Turnidge JD, Castanheira M, Jones RN. Emergence and widespread dissemination of OXA-23, -24/40 and -58 carbapenemases among *Acinetobacter* spp. in Asia-Pacific Nations: report from the SENTRY surveillance program. *J. Antimicrob. Chemother.* 63(1), 55–59 (2009).
24. Hamouda A, Evans BA, Towner KJ, Amyes SG. 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(7), 2476–2483 (2010).

25. Towner KJ, Levi K, Vlassiadi M. Genetic diversity of carbapenem-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 14(2), 161–167 (2008).
 26. Grundmann H, Towner K, Dijkshoorn L, *et al.* Multicenter study using standardized protocols and reagents for evaluation of reproducibility of PCR-based fingerprinting of *Acinetobacter* spp. *J. Clin. Microbiol.* 35(12), 3071–3077 (1997).
- *Quality-controlled reagents, standardized DNA extraction and standardized amplification conditions can produce inter-laboratory reproducible PCR-based fingerprinting.
27. Chang HL, Tang CH, Hsu YM, *et al.* Nosocomial outbreak of infection with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a medical center in Taiwan. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 30(1), 34–38 (2009).
 28. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 19(24), 6823–6831 (1991).
 29. Reboli AC, Houston ED, Monteforte JS, Wood C, Hamill RJ. Discrimination of epidemic and sporadic isolates of *Acinetobacter baumannii* by repetitive element PCR-mediated DNA fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* 32(11), 2635–2640 (1994).
 30. Bou G, Cervero G, Dominguez M, Quereda C, Martinez-Beltran J. 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.* 6(12), 635–643 (2000).
 31. Saeed S, Fakhri MG, Riederer K, Shah AR, Khatib R. Interinstitutional and intrainstitutional transmission of a strain of *Acinetobacter baumannii* detected by molecular analysis: comparison of pulsed-field gel electrophoresis and repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 27(9), 981–983 (2006).
 32. Higgins PG, Dammhayn C, Hackel M, Seifert H. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 65(2), 233–238 (2010).

*Delineation of eight international clonal lineages by DiversiLab.

33. Weisenberg SA, Schuetz AN, Alexander EA, *et al.* Endemic *Acinetobacter baumannii* in a New York hospital. *PloS One*. 6(12), e28566 (2011).
 34. Higgins PG, Janssen K, Fresen MM, Wisplinghoff H, Seifert H. 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(11), 3493–3500 (2012).
 35. Decker BK, Perez F, Hujer AM, *et al.* Longitudinal analysis of the temporal evolution of *Acinetobacter baumannii* strains in Ohio, USA, by using rapid automated typing methods. *PloS One*. 7(4), e33443 (2012).
 36. Lindstedt BA. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. *Electrophoresis*. 26(13), 2567–2582 (2005).
 37. Pourcel C, Minandri F, Hauck Y, *et al.* 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(2), 539–548 (2011).
- *Development of first validated MLVA scheme for *Acinetobacter baumannii* as well as a MLVA database.
38. Turton JF, Matos J, Kaufmann ME, Pitt TL. Variable number tandem repeat loci providing discrimination within widespread genotypes of *Acinetobacter baumannii*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 28(5), 499–507 (2009).
 39. Hauck Y, Soler C, Jault P, *et al.* Diversity of *Acinetobacter baumannii* in four french military hospitals, as assessed by multiple locus variable number of tandem repeats analysis. *PLoS ONE*. 7(9), e44597 (2012).
 40. Hu Y, Li B, Jin D, *et al.* Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis of *Acinetobacter baumannii* in China: comparison with PFGE typing. *J. Clin. Microbiol.* 51(4), 1263–1268 (2013).
 41. Lewis T, Loman N, Bingle L, *et al.* High-throughput whole-genome sequencing to dissect the epidemiology of *Acinetobacter baumannii* isolates from a hospital outbreak. *J. Hosp. Infect.* 75(1), 37–41 (2010).

42. Snitkin ES, Zelazny AM, Montero CI, *et al.* Genome-wide recombination drives diversification of epidemic strains of *Acinetobacter baumannii*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108(33), 13758–13763 (2011).
43. Wright MS, Haft DH, Harkins DM, *et al.* New insights into dissemination and variation of the health care-associated pathogen *Acinetobacter baumannii* from genomic analysis. *mBio.* 5(1), e00963–00913 (2014).
44. Adams MD, Chan ER, Molyneaux ND, Bonomo RA. Genomewide analysis of divergence of antibiotic resistance determinants in closely related isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54(9), 3569–3577 (2010).
45. Di Nocera PP, Rocco F, Giannouli M, Triassi M, Zarrilli R. Genome organization of epidemic *Acinetobacter baumannii* strains. *BMC Microbiol.* 11, 224 (2011).
46. Adams MD, Goglin K, Molyneaux N, *et al.* Comparative genome sequence analysis of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Bacteriol.* 190(24), 8053–8064 (2008).
47. Sahl J, Johnson J, Harris A, *et al.* Genomic comparison of multi-drug resistant invasive and colonizing *Acinetobacter baumannii* isolated from diverse human body sites reveals genomic plasticity. *BMC Genomics.* 12(1), 291 (2011).
48. Imperi F, Antunes LC, Blom J, *et al.* The genomics of *Acinetobacter baumannii*: insights into genome plasticity, antimicrobial resistance and pathogenicity. *IUBMB Life.* 63(12), 1068–1074 (2011).
49. Poirel L, Menuteau O, Agoli N, Cattoen C, Nordmann P. Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. *J. Clin. Microbiol.* 41(8), 3542–3547 (2003).
50. Naas T, Coignard B, Carbonne A, *et al.* VEB-1 Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii*, France. *Emerg. Infect. Dis.* 12(8), 1214–1222 (2006).
51. Turton JF, Kaufmann ME, Glover J, *et al.* Detection and typing of integrons in epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* found in the United Kingdom. *J. Clin. Microbiol.* 43(7), 3074–3082 (2005).

52. Jin H, Xu X, Mi Z, Mou Y, Liu P. Drug-resistant gene based genotyping for *Acinetobacter baumannii* in tracing epidemiological events and for clinical treatment within nosocomial settings. *Chin. Med. J. (Engl.)*. 122(3), 301–306 (2009).
53. Hamidian M, Wynn M, Holt KE, Pickard D, Dougan G, Hall RM. Identification of a marker for two lineages within the GC1 clone of *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 69(2), 557–8 (2014).
54. Nigro SJ, Hall RM. Antibiotic resistance islands in A320 (RUH134), the reference strain for *Acinetobacter baumannii* global clone 2. *J. Antimicrob. Chemother.* 67(2), 335–338 (2012).
55. Hu D, Liu B, Dijkshoorn L, Wang L, Reeves PR. Diversity in the major polysaccharide antigen of *Acinetobacter baumannii* assessed by DNA sequencing, and development of a molecular serotyping scheme. *PLoS ONE*. 8(7), e70329 (2013).
56. Turton JF, Baddal B, Perry C. Use of the accessory genome for characterization and typing of *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* 49(4), 1260–1266 (2011).
57. Seifert H, Schulze A, Baginski R, Pulverer G. Comparison of four different methods for epidemiologic typing of *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* 32(7), 1816–1819 (1994).
58. Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.* 12(9), 826–836 (2006).
59. Nemeč A, Dijkshoorn L, van der Reijden TJ. Long-term predominance of two pan-European clones among multi-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in the Czech Republic. *J. Med. Microbiol.* 53(2), 147 (2004).
60. Bertini A, Poirel L, Mugnier PD, Villa L, Nordmann P, Carattoli A. Characterization and PCR-based replicon typing of resistance plasmids in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54(10), 4168–4177 (2010).
61. Dijkshoorn L, Aucken H, Gerner-Smidt P, *et al.* Comparison of outbreak and nonoutbreak *Acinetobacter baumannii* strains by genotypic and phenotypic methods. *J. Clin. Microbiol.* 34(6), 1519–25 (1996).

**First evidence of the presence of two European clones (clone I and II) by using multiple typing methods.

62. Diancourt L, Passet V, Nemeč A, Dijkshoorn L, Brisse S. The Population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PLoS ONE*. 5(4), e10034 (2010).

*Development of the second MLST scheme for *A. baumannii*.

63. Van Dessel H, Dijkshoorn L, Van Der Reijden T, *et al.* Identification of a new geographically widespread multiresistant *Acinetobacter baumannii* clone from European hospitals. *Res. Microbiol.* 155(2), 105–112 (2004).

*First description of third European clone.

64. Severino P, Brisse S. Ribotyping in clinical microbiology. In: *Medical biomethods handbook*,. Walker JM, Rapley R (Eds.). Humana Press, Totowa, US, 573–581 (2005).
65. Wisplinghoff H, Seifert H. Molecular epidemiology of *Acinetobacter* species. In: *Acinetobacter biology and pathogenesis*. Bergogne-Bérézin E, Friedman H, Bendinelli M (Eds.). Springer, New York, US, 61–83 (2008).
66. Dijkshoorn L, Nemeč A. The diversity of the genus *Acinetobacter*. In: *Acinetobacter molecular microbiology*. Gerischer U (Ed.). Caister Academic Press, Norfolk, UK, 1–34 (2008).
67. Metan G, Sariguzel F, Sumerkan B, Reijden TV, Dijkshoorn L. Clonal diversity and high prevalence of OXA-58 among *Acinetobacter baumannii* isolates from blood cultures in a tertiary care centre in Turkey. *Infect. Genet. Evol.* 14, 92–97 (2013).
68. Coyne S, Courvalin P, Périchon B. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55(3), 947–953 (2011).
69. Huys G, Cnockaert M, Nemeč A, Swings J. Sequence-based typing of *adeB* as a potential tool to identify intraspecific groups among clinical strains of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* 43(10), 5327–5331 (2005).

70. Ansaldi F, Canepa P, Bassetti M, *et al.* 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(2), 134–140 (2011).
71. La Scola B, Gundi VA, Khamis A, Raoult D. Sequencing of the *rpoB* gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter* species. *J. Clin. Microbiol.* 44(3), 827 (2006).
72. Schuetz AN, Huard RC, Eshoo MW, *et al.* 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(1), 14–19 (2012).
73. Evans BA, Amyes SG. OXA β -Lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* 27(2), 241–263 (2014).
74. Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the *bla*_{OXA-51-like} carbapenemase gene intrinsic to this species. *J. Clin. Microbiol.* 44(8), 2974–2976 (2006).
75. Evans BA, Hamouda A, Towner KJ, Amyes SG. OXA-51-like beta-lactamases and their association with particular epidemic lineages of *Acinetobacter baumannii*. *Clin. Microbiol. Infect.* 14(3), 268–275 (2008).
76. Zander E, Nemec A, Seifert H, Higgins PG. Association between β -lactamase-encoding *bla*_{OXA-51} variants and DiversiLab rep-PCR-based typing of *Acinetobacter baumannii* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 50(6), 1900–1904 (2012).
77. Pournaras S, Gogou V, Giannouli M, *et al.* Single locus sequence-based typing of *bla*_{OXA-51-like} gene for rapid classification of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates to international clones. *J. Clin. Microbiol.* 52(5), 1653–1657 (2014).
78. Krawczyk B, Lewandowski K, Kur J. Comparative studies of the *Acinetobacter* genus and the species identification method based on the *recA* sequences. *Mol. Cell. Probes.* 16(1), 1–11 (2002).

79. La Scola B, Raoult D. *Acinetobacter baumannii* in human body louse. *Emerg. Infect. Dis.* 10(9), 1671–1673 (2004).
80. Kempf M, Abdissa A, Diatta G, *et al.* Detection of *Acinetobacter baumannii* in human head and body lice from Ethiopia and identification of new genotypes. *Int. J. Infect. Dis.* 16(9), e680–683 (2012).
81. Turton JF, Gabriel S, Valderrey C, Kaufmann ME, Pitt TL. Use of sequence-based typing and multiplex PCR to identify clonal lineages of outbreak strains of *Acinetobacter baumannii*. *Clin. Microbiol. Infect.* 13(8), 807–815 (2007).
82. Giannouli M, Tomasone F, Agodi A, *et al.* Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in intensive care units of multiple Mediterranean hospitals. *J. Antimicrob. Chemother.* 63(4), 828–830 (2009).
83. Giannouli M, Cuccurullo S, Crivaro V, *et al.* Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care hospital in Naples, Italy, shows the emergence of a novel epidemic clone. *J. Clin. Microbiol.* 48(4), 1223–1230 (2010).
84. Karah N, Haldorsen B, Hermansen NO, *et al.* Emergence of OXA-carbapenemase- and 16S rRNA methylase-producing international clones of *Acinetobacter baumannii* in Norway. *J. Med. Microbiol.* 60(Pt 4), 515–521 (2011).
85. 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).
86. Bonnin RA, Poirel L, Licker M, Nordmann P. Genetic diversity of carbapenem-hydrolysing β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* from Romanian hospitals. *Clin. Microbiol. Infect.* 17(10), 1524–1528 (2011).
87. Spratt BG. Exploring the concept of clonality in bacteria. In: *Genomics, proteomics, and clinical bacteriology*. Woodford N, Johnson AP (Eds.). Humana Press, Totowa, US, 323–352 (2004).

88. Bartual SG, Seifert H, Hippler C, Luzon MA, Wisplinghoff H, Rodríguez-Valera F. Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* 43(9), 4382–4390 (2005).

*Development of first MLST scheme for *A. baumannii*.

89. Park YK, Jung SI, Park KH, *et al.* Independent emergence of colistin-resistant *Acinetobacter* spp. isolates from Korea. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 64(1), 43–51 (2009).
90. Grosso F, Quinteira S, Peixe L. Understanding the dynamics of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* lineages within Portugal. *Clin. Microbiol. Infect.* 17(8), 1275–1279 (2011).
91. Ecker JA, Massire C, Hall TA, *et al.* Identification of *Acinetobacter* species and genotyping of *Acinetobacter baumannii* by multilocus PCR and mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 44(8), 2921–2932 (2006).
92. Wolk DM, Kaleta EJ, Wysocki VH. PCR-electrospray ionization mass spectrometry: the potential to change infectious disease diagnostics in clinical and public health laboratories. *J. Mol. Diagn. JMD.* 14(4), 295–304 (2012).
93. Perez F, Endimiani A, Ray AJ, *et al.* Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* across a hospital system: impact of post-acute care facilities on dissemination. *J. Antimicrob. Chemother.* 65(8), 1807–1818 (2010).
94. Mencacci A, Monari C, Leli C, *et al.* Typing of nosocomial outbreaks of *Acinetobacter baumannii* by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 51(2), 603–606 (2013).

Table 1: Epidemiological typing methods used to type *A. baumannii* and their application. GE for gel electrophoresis and NV for not validated

Typing molecular method		Genetic target	Main steps	Advantages	Limitations	Applications	references
Fragment based-method	PCR-based replicon typing scheme	Intrinsic plasmid (19 groups based on their replicase genes homology)	6 PCR multiplexes defining the 19 plasmid homology groups	Easy, cheap, multifunctional tool	Need of validation	Determination of <i>Acinetobacter</i> pan plasmidome, circulating plasmids, evolution of resistance genes	[60]
	RAPD	Whole genome	PCR with arbitrary primers followed by GE	Rapid, easy, simple, acceptable discriminatory power	Lack of inter and intra reproducibility and unportability of results	Screening epidemiological tool at local scale.	[26]
	Rep-PCR	Whole genome, especially sequences located between repetitive sequences	PCR with outwardly primers complementary to repetitive sequences (rep1 and rep2) followed by GE	Easy, rapid, high discriminatory power DiversiLab™ (automated form): high intra and inter laboratory reproducibility, good portability	Manual form: Lack of inter and intra reproducibility DiversiLab™: Very expensive, need of manual extraction and lack of similarity cut-offs provided by	DiversiLab™: Clonal screen at local, large scale, and during population structure studies.	[29,32]

				manufacturer		
Ribotyping	rDNA and flanking regions	DNA restriction (<i>EcoRI</i> or <i>HindIII</i> and <i>HincII</i>) followed by southern blot and probe hybridizations	High resolution, reproducibility	Low discriminatory power Manual form: laborious method Riboprinter™ (automated form): expensive, need manual correction of its clustering	Identification of <i>A. baumannii</i> complex at species, clone (including international clones), and at lesser extent at epidemic strain level	[59,61]
PFGE	Whole genome	DNA restriction by infrequent cutter (<i>ApaI</i>) followed by PFGE	High discriminatory power	laborious method, un-typeability of some strains, lack of inter-reproducibility, un-portability of results	Gold standard for typing at defined spatial and temporal span interval, and important complementary epidemiological tool at large scale.	[10]
AFLP	Whole genome	DNA restriction by 2 enzymes (<i>MseI</i> and <i>EcoRI</i>) simultaneously performed with adaptors ligation,	Deep resolution of genomic relatedness at different levels (species, clone, strain); high	Laborious, expensive, lack of inter-reproducibility	Important tool in <i>Acinetobacter</i> taxonomy (identification of species) and Gold standard for	[59]

			followed by selective amplification with <i>Cyc-5 EcoRI+A</i> and <i>MseI+C</i> primers (A and C selective nucleotides) and GE	discriminatory power, presence of established database		molecular epidemiology of <i>Acinetobacter</i> at local and large scale	
	MLVA	Genetic polymorphism within VNTR loci	Amplification of VNTR loci followed by GE	Portability, reproducibility, high discriminatory power, amenability to automation, availability of electronic database	Rapid evolution of certain loci, careful interpretation of results	Performing typing at fine scale on very closely related strains, as well as at large scale and population structure studies	[37–40]
Sequence based-method	SLST	Single locus sequence polymorphism (ex: <i>adeB</i> , <i>rpoB</i> , <i>recA</i> , <i>bla_{OXA-51-like}</i>).	<i>adeB</i> : internal fragment analysis (850 pb) <i>rpoB</i> : partial sequencing (zone I=350 pb or zone II=450 pb) <i>recA</i> : partial sequencing of 336 pb of genes.	Rapid, easy	Limited discriminatory power at local scale typing, it must be coupled with other typing methods. Genes as <i>rpoB</i> require further validation	Usefulness for preliminary typing approaches and assigning an isolate to established international clones (especially <i>bla_{OXA-51}</i> , 3LST	[21,69,71,75,79,81]

		<i>bla</i> _{OXA-51} : full gene sequencing			and at lesser extent <i>adeB</i>). Other genes need validation and further studies	
3-LST	Polymorphism within 3 loci <i>ompA</i> , <i>csuE</i> , <i>bla</i> _{OXA-51} .	Sequence analysis of <i>ompA</i> (686 pb), <i>csuE</i> (449 pb), <i>bla</i> _{OXA-51} (693 pb) or multiplex PCR targetting these 3 genes	Rapid, easy, availability of electronic database			
Bartual's MLST	Polymorphism within 7 housekeeping genes	Internal sequence analysis of 7 genes (<i>gltA</i> , <i>gyrB</i> , <i>gdhB</i> , <i>recA</i> , <i>cpn60</i> , <i>gpi</i> , <i>rpoD</i>)	Portability, reproducibility, high resolution at clone level, availability of electronic database	Labor, limited discriminatory power, careful interpretation of recombination bias	Method of choice for long term global studies and for population structure studies	[62,88]
Pasteur's MLST		Internal sequence analysis of 7 genes of (<i>cpn60</i> , <i>fusA</i> , <i>gltA</i> , <i>pyrG</i> , <i>recA</i> , <i>rplB</i> , <i>rpoB</i>)				
PCR-ESI/MS	Polymorphism within 9 internal fragments of 6 housekeeping genes	Multilocus PCR amplification (9 primers: one primer for each <i>trpE</i> , <i>adk</i> , <i>efp</i> , and <i>ppa</i> genes, two for <i>mutY</i> , and three for <i>fumC</i>)	Rapid, portability, automated (plexID TM), multifunctional tool	Expensive, limited accessibility in clinical laboratories	Good ability for identification, genotyping at clone level and at lesser extent at strain level, for population structure studies	[91]

		followed by ESI-MS.			as well as for determination of antibiotic resistance	
Whole genome sequencing	Whole genome polymorphism	Whole genome sequencing and comparative genome analysis	Rapid, automated with high throughput sequencing techniques	Expensive, Limited accessibility in clinical laboratories	Good ability for performing genotyping at fine scale, as well as giving answers for a lot of questions (typing, resistance genes, therapeutic approach) at same time	[41–43,45]
Accessory genome-based method	Open pan genome	Accessory genetic elements analysis such as resistance genes, integrons, resistance islands	Produce interested information of tested strain	Instability of accessory genes (gain or loss), characterization of isolates rather than typing, difficulty on clinical practice	Ability for performing genotyping at fine scale, characterization of clones and definition of effective therapeutic approaches	[51–56]

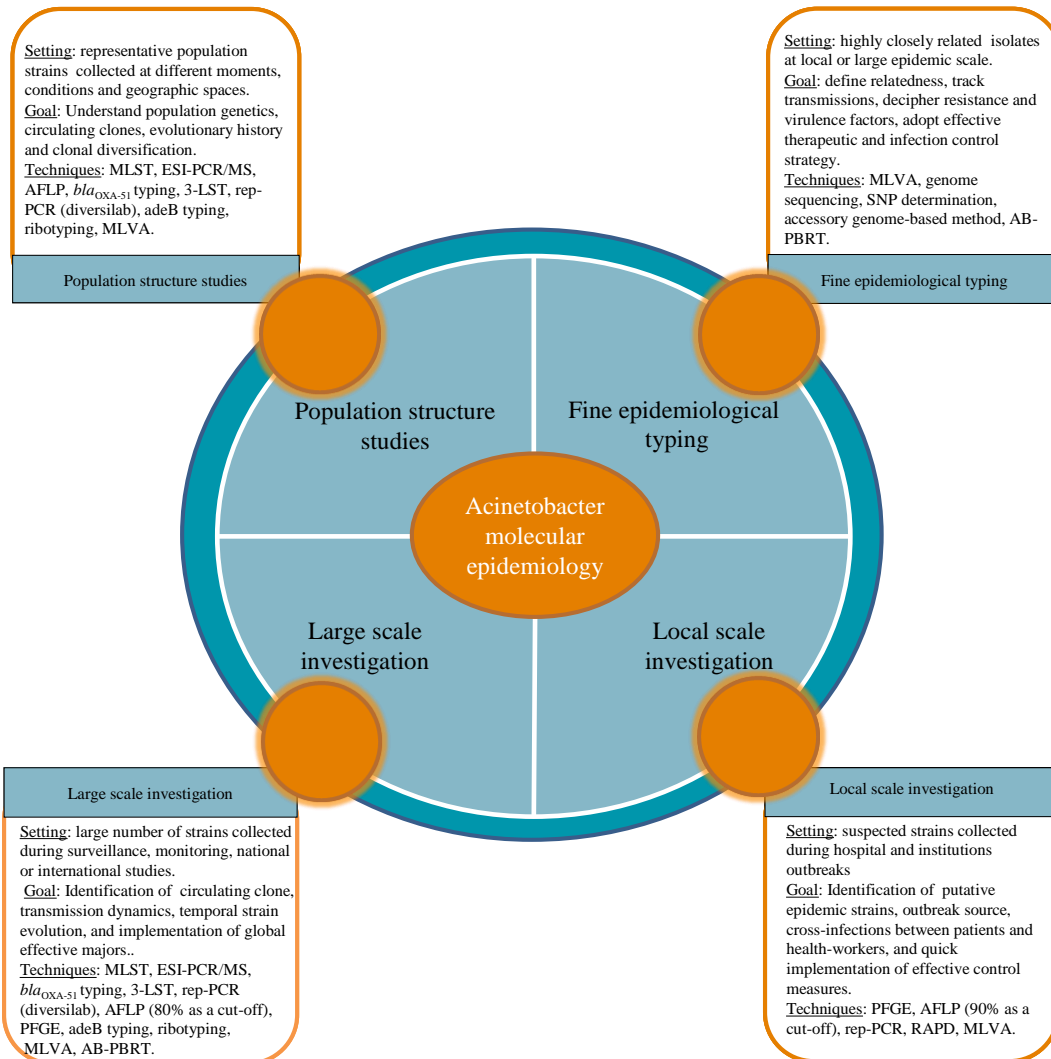


Figure 1: The four major aims for *Acinetobacter baumannii* typing, the setting of application, the goal as well as the used

Commentaires:

Cette revue décrit les principales méthodes moléculaires disponibles pour le typage d'*A. baumannii*. Les publications les plus récentes montrent que la communauté scientifique s'oriente de plus en plus vers l'utilisation de méthodes moléculaires automatisées, reproductibles, et assistées par ordinateur. Ainsi, les résultats peuvent être stockés dans des bases de données, échangés et comparés à l'échelle locale, régionale, nationale ou encore internationale. Les méthodes basées sur le séquençage de certains gènes ou encore sur la comparaison des profils de bandes après électrophorèse seront à terme de moins en moins utilisées. Aujourd'hui, la disponibilité de séquenceurs de nouvelle génération dans les laboratoires est encore limitée, mais les approches du séquençage de génome entier seront très certainement parmi les méthodes de référence de génotypage dans un proche avenir. Ainsi, cette méthode ouvrira de nouveaux champs d'application dans le domaine du typage, telle que la sélection de *loci* utiles ou de schémas rapides de polymorphisme de gène. Toutefois, la spectrométrie de masse MALDI-TOF (méthode de typage phénotypique) est également une méthode de typage simple et prometteuse (Mencacci et al., 2013). Enfin, dans l'objectif de comprendre l'épidémiologie à l'échelle mondiale, il est nécessaire de développer des réseaux collectant toutes les données épidémiologiques d'*A. baumannii* afin de valider les méthodes de typage disponibles, de coordonner et d'harmoniser les, et de définir une dénomination standard pour les nouveaux clones.

Partie expérimentale

Chapitre un-Article 1

First report of *bla*_{NDM-1} producing *Acinetobacter baumannii* isolated in Lebanon from civilians wounded during the Syrian War

Rayane Rafei^{1,2}, Fouad Dabboussi², Monzer Hamze², Matthieu Eveillard^{1,3} Carole Lemarié³, Hassan Mallat², Jean-Marc Rolain⁴, Marie-Laure Joly-Guillou^{1,3}, Marie Kempf^{1,3*}

Article publié dans *Int J Infect Dis* 2014; 21:21-3. doi: 10.1016/j.ijid.2014.01.004.

¹ L'UNAM Université, Université d'Angers, Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, UPRES EA3142, Institut de Biologie en Santé – IRIS, CHU, 4, rue Larrey, 49933 Angers cedex, France.

² Université Libanaise, Ecole doctorale des sciences et de technologie, Centre AZM pour la recherche en Biotechnologie et ses applications, Laboratoire de microbiologie, rue El- Mitein, Tripoli, Liban.

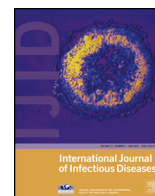
³ Laboratoire de Bactériologie, Institut de Biologie en Santé - PBH, CHU, 4 rue Larrey, 49933 Angers cedex, France.

⁴ Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Emergents (URMITE), CNRS-IRD, UMR 6236, IHU Méditerranée Infection, Aix-Marseille Université, 27 Bd Jean Moulin 13385 Marseille Cedex 05, France.

Introduction

Les carbapénèmes sont depuis longtemps considérées comme le traitement de choix des infections à *A. baumannii*. Néanmoins, la résistance à ces antibiotiques est de plus en plus rapportée mondialement (Evans et al., 2013). Les principaux mécanismes de résistance à ces agents sont la production d'oxacillinases, notamment les oxacillinases OXA-23, OXA-24 et OXA-58 (Kempf and Rolain, 2012). La production des métallo- β -lactamases reste un mécanisme rare chez *A. baumannii*. NDM-1, une nouvelle enzyme appartenant à la classe de métallo- β -lactamases, a été récemment rapportée chez les entérobactéries (Yong et al., 2009). Depuis cette première description, la présence de NDM-1 a largement été rapportée chez les entérobactéries. NDM-1 et NDM-2 ont été décrites chez *Acinetobacter* (Dortet et al., 2014).

Récemment, nous avons identifié et caractérisé quatre souches d'*A. baumannii* résistantes aux carbapénèmes qui ont été isolées chez des patients d'origine syrienne blessés pendant le conflit syrien et soignés à l'hôpital gouvernemental de Tripoli, à Kobbé, Tripoli, au Nord du Liban. Ces souches ont été typées par électrophorèse en champ pulsé (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE), multilocus sequence typing (MLST) et séquençage d'un seul locus *bla*_{OXA-51} (*bla*_{OXA-51} sequence based-typing, *bla*_{OXA-51} SBT) et leur mécanisme de résistance a été identifié.



Short Communication

First report of *bla*_{NDM-1}-producing *Acinetobacter baumannii* isolated in Lebanon from civilians wounded during the Syrian war



Rayane Rafei^{a,b}, Fouad Dabboussi^b, Monzer Hamze^b, Matthieu Eveillard^{a,c}, Carole Lemarié^c, Hassan Mallat^b, Jean-Marc Rolain^d, Marie-Laure Joly-Guillou^{a,c}, Marie Kempf^{a,c,*}

^a Institut de Biologie en Santé – IRIS, Groupe d'Etude des Interactions Hôte–Pathogène, Université d'Angers, L'UNAM, Angers, France

^b Laboratoire de Microbiologie, Ecole Doctorale des Sciences et de Technologie, Université Libanaise, Tripoli, Lebanon

^c Laboratoire de Bactériologie, Institut de Biologie en Santé – PBH, CHU, 4 rue Larrey, 49933 Angers cedex, France

^d Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Emergents (URMITE), IHU Méditerranée Infection, Aix-Marseille Université, Marseille, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 November 2013

Received in revised form 31 December 2013

Accepted 3 January 2014

Corresponding Editor: Eskild Petersen, Aarhus, Denmark

Keywords:

NDM-1

Acinetobacter baumannii

Syrian civil war

Lebanon

Multidrug-resistant bacteria

SUMMARY

Objectives: The emergence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* has been observed worldwide. We describe the first detection of *A. baumannii* carrying the *bla*_{NDM-1} gene in Lebanon, isolated from Syrian patients wounded during the civil war.

Methods: Four carbapenem-resistant *A. baumannii* strains isolated in 2012 in the Tripoli Government Hospital, Lebanon, from civilians wounded during the Syrian war, were analysed. Susceptibility was determined by disk diffusion testing, and resistance to carbapenems was confirmed by Etest. The presence of *bla*_{OXA-23}-like, *bla*_{OXA-24}-like, *bla*_{OXA-58}-like, *bla*_{OXA-143}-like, and *bla*_{NDM} was investigated by PCR. Clonal relationships were studied by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), multilocus sequence typing (MLST), and *bla*_{OXA-51} sequence-based typing.

Results: All isolates harboured the *bla*_{NDM-1} gene and were negative for other tested carbapenemases. They all belonged to the sequence type 85 and formed a single cluster by PFGE. Finally, *bla*_{OXA-51}-like gene sequencing revealed the presence of the *bla*_{OXA-94} variant in all four isolates.

Conclusion: These findings show that Syria constitutes a reservoir for NDM-1-producing bacteria. These results also highlight the need for effective measures to stop the threatening spread of such strains.

© 2014 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-SA license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>).

1. Introduction

Multidrug-resistant (MDR) *Acinetobacter baumannii* are associated with a wide spectrum of infectious diseases, ranging from nosocomial and community-acquired infections to those acquired in natural disasters or war.¹ The main mechanism of resistance to carbapenems in *A. baumannii* is the production of acquired OXA-type carbapenemases, encoded mostly by *bla*_{OXA-23}-like, *bla*_{OXA-24}-like, and *bla*_{OXA-58}-like genes, which have been identified frequently worldwide.¹ In 2008, New Delhi metallo-β-lactamase 1 (NDM-1), encoded by the *bla*_{NDM-1} gene and conferring resistance to all the β-lactams including carbapenems, was discovered in *Enterobacteriaceae* isolates isolated in Sweden from a patient hospitalized in India.² Since this first description, the enzyme has been reported

throughout the world as an emerging carbapenemase widely detected in clinical *Enterobacteriaceae*, but also in *A. baumannii*, in which the *bla*_{NDM-1} and *bla*_{NDM-2} genes have recently been identified.³

Here, we report the first detection of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the *bla*_{NDM-1} gene in Lebanon, isolated from Syrian patients wounded during the civil war.

2. Materials and methods

2.1. Isolates and antimicrobial susceptibility testing

A total of four carbapenem-resistant *A. baumannii* isolates were analysed. Species identification was confirmed by real-time PCR of the *bla*_{OXA-51} gene and *rpoB* gene sequencing.⁴ Antimicrobial susceptibility was determined by disk diffusion, in accordance with the recommendations of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (<http://www.eucast.org>),

* 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).

Table 1
Epidemiological data of the four carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the *bla*_{NDM-1} gene isolated in Lebanon from Syrian war casualties

Patient	Age/gender	Nationality	Isolation source	Hospital ^a	Admission date (DD/MM/YYYY)	Antibiotic susceptibility										
						IMI	MER	DOR	CAZ	CIP	GM	AM	COL	TG	RIF	DOX
1	24/M	Syrian	Wound, foot	TGH	29/05/2012	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S
2	24/M	Syrian	Wound, foot	TGH	02/06/2012	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S
3	14/F	Syrian	Wound, hand	TGH	14/06/2012	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S
4	1/F	Syrian	Wound, shoulder	TGH	14/06/2012	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S

IMI, imipenem; MER, meropenem; DOR, doripenem; CAZ, ceftazidime; CIP, ciprofloxacin; GM, gentamicin; AM, amikacin; COL, colistin; TG, tigecycline; RIF, rifampin; DOX, doxycycline; R, resistant; S, susceptible.

^a TGH, Tripoli Governmental Hospital, government hospital of Kobbe, Tripoli, in northern Lebanon.

and resistance to carbapenems (imipenem, meropenem, and doripenem) was confirmed by Etest diffusion (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

2.2. PCR assays and molecular typing

Real-time PCR was done to screen for the presence of *bla*_{OXA-23}-like, *bla*_{OXA-24}-like, *bla*_{OXA-58}-like, and *bla*_{OXA-143}-like genes.⁵ The presence of *bla*_{NDM} genes was investigated by standard PCR amplification. Sequencing of the entire carbapenem resistance gene was performed.

Genotyping was performed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) using *Apal* enzyme and multilocus sequence typing (MLST), in accordance with the Pasteur Institute instructions (<http://www.pasteur.fr/mlst>). Moreover, the *bla*_{OXA-51}-like gene was sequenced and compared to all identified variants.

3. Results and discussion

The carbapenem-resistant *A. baumannii* presented here were isolated from civilians wounded in 2012 during the Syrian war and admitted to the government hospital of Kobbe, Tripoli, in northern Lebanon (Table 1). The four isolates had high-level resistance to carbapenems since the minimum inhibitory concentrations (MICs) for imipenem, meropenem, and doripenem were >32 mg/l. The isolates were also resistant to fluoroquinolones, but remained susceptible to aminoglycosides, doxycycline, tigecycline, rifampin, and colistin. They all carried the *bla*_{NDM} gene and were negative for the other carbapenem resistance genes tested. Sequencing of the *bla*_{NDM} gene showed that the variant was the *bla*_{NDM-1} gene in all four isolates.

Multidrug-resistant and *bla*_{NDM-1} gene-carrying *A. baumannii* are increasingly reported worldwide. Since 2010, they have been identified in various parts of the world, in particular in North Africa and the Middle East,⁶ but to our knowledge, this is the first report of carbapenem-resistant *A. baumannii* carrying the *bla*_{NDM-1} gene in Lebanon. However, two NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* imported from Iraq were detected in 2010.⁷ To date, no NDM-1-producing *A. baumannii* has been described in Syria; however this is a country where data on the prevalence of *A. baumannii* antibiotic resistance remain limited. Recently, Hamzeh et al. published a report in which 260 *A. baumannii* isolates isolated from patients hospitalized in the area of Aleppo were studied.⁸ They showed that 66% of the isolates were resistant to carbapenems, but no further molecular epidemiological studies to explore resistance mechanisms were performed.

Outbreaks of MDR *A. baumannii* infections have been reported previously during war, as shown by Scott et al. and Kusradze et al., who studied the bacteria isolated in US service members injured in Iraq.^{9,10} However, no isolate harbouring a *bla*_{NDM-1} gene was found among the casualties. Although a majority of NDM-1-producing *A. baumannii* are isolated in the hospital setting, it is possible that the

bacterium can be isolated from various environmental locations worldwide, even if the reservoir of such MDR isolates is not yet well known. In the present study, the origin of the *A. baumannii* infection in injured patients was difficult to determine. We were unable to obtain information on the date of injury, conditions of care, or on the treatment administered in Syria. The infection may have been acquired from environmental sources on the battlefield, during the patient's stay in Syrian clinics, or during evacuation from the operation theatre to Lebanon.

The PFGE analysis showed that the four isolates shared identical patterns. The MLST analysis showed that all isolates belonged to sequence type 85 (ST85), and sequencing of the *bla*_{OXA-51}-like gene identified *bla*_{OXA-94} as a unique variant. Reports of ST85-type strains worldwide are rare. Two *A. baumannii* belonging to the ST85 clone and carrying the *bla*_{NDM-1} gene have recently been described in France. Those strains were isolated from rectal swabs and harboured the *bla*_{OXA-94} variant.⁶

In conclusion, this study reports the spread of NDM-1-producing *A. baumannii* in Syria, showing that this country constitutes a reservoir for NDM-1-producing bacteria. This information is of major importance, since because of the civil war, many injured people are being transferred to foreign hospitals for treatment. Among these hospitals, those in Lebanon are the first affected. These results highlight the importance of implementing effective infection control measures to stop the threatening spread of such resistant microorganisms.

Acknowledgements

The authors thank the Lebanese University and the National Council for Scientific Research, Lebanon for their funding of this research. We thank Linda Hadjadj, Mariam Yehya, Aicha Borghol, and Taha Abdou for technical assistance.

Conflict of interest: The authors declare that no conflicts of interest exist.

References

- 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.
- Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, et al. 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* 2009;**53**:5046–54.
- Espinal P, Poirel L, Carmeli Y, Kaase M, Pal T, Nordmann P, et al. Spread of NDM-2-producing *Acinetobacter baumannii* in the Middle East. *J Antimicrob Chemother* 2013;**68**:1928–30.
- Gundi VA, Dijkshoorn L, Burignat S, Raoult D, La Scola B. Validation of partial *rpoB* gene sequence analysis for the identification of clinically important and emerging *Acinetobacter* species. *Microbiology* 2009;**155**:2333–41.
- Bakour S, Kempf M, Touati A, Ait Ameur A, Haouchine D, Sahli F, et al. Carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in two university hospitals in Algeria. *J Med Microbiol* 2012;**61**:1341–3.

6. Bonnin RA, Poirel L, Naas T, Pirs M, Seme K, Schrenzel J, et al. Dissemination of New Delhi metallo-beta-lactamase-1-producing *Acinetobacter baumannii* in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2012;**18**:E362–5.
7. El-Herte RI, Araj GF, Matar GM, Baroud M, Kanafani ZA, Kanj SS. Detection of carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing NDM-1 in Lebanon. *J Infect Dev Ctries* 2012;**6**:457–61.
8. Hamzeh AR, Al Najjar M, Mahfoud M. Prevalence of antibiotic resistance among *Acinetobacter baumannii* isolates from Aleppo, Syria. *Am J Infect Control* 2012;**40**:776–7.
9. Scott P, Deye G, Srinivasan A, Murray C, Moran K, Hulten E, et al. 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* 2007;**44**:1577–84.
10. Kusradze I, Diene SM, Goderdzishvili M, Rolain JM. Molecular detection of OXA carbapenemase genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Iraq and Georgia. *Int J Antimicrob Agents* 2011;**38**:164–8.

Commentaires

Les quatre souches d'*A. baumannii* isolées de patients syriens hospitalisés au Liban possédaient toutes le gène *bla*_{NDM-1}. Les résultats de typage par PFGE ont révélé la présence d'un seul clone, les profils électrophorétiques des 4 souches étant similaires. Ces résultats ont été confirmés par les résultats du séquençage par MLST qui a identifié un seul séquençotype, le ST85, et par le séquençage du gène *bla*_{OXA-51-like}, qui a mis en évidence un seul variant, le variant *bla*_{OXA-94}.

Le ST85 a été identifié pour la première fois lors d'une étude réalisée en Grèce (Gogou et al., 2011). Par la suite, des souches productrices de la carbapénèmase NDM-1 et appartenant au ST85 ont été identifiés en France. Ainsi, Bonin et ses collègues ont identifié 8 isolats de ce ST dont 6 étaient importés d'Algérie, 1 de Tunisie et 1 d'Égypte. Une analyse par électrophorèse en champ pulsé a montré que tous ces isolats appartenaient à un même clone. Les auteurs ont suggéré que le Nord de l'Afrique pouvait être un réservoir potentiel pour ces souches (Bonnin et al., 2013a). Par ailleurs, une épidémie à *A. baumannii* est survenue dans une unité de soins intensifs française entre janvier et mai 2013, avec des souches productrices de NDM-1 de ST85. Le cas index provenait d'Algérie et la souche a diffusé vers cinq autres patients qui ont été infectés ou simplement colonisés (Decousser et al., 2013).

Notre étude est la première rapportant la présence de souches d'*A. baumannii* portant le gène *bla*_{NDM-1} sur le territoire libanais. Ces résultats soulignent entre autre l'importance d'implémenter des mesures efficaces pour éviter la dissémination de cette souche dans les hôpitaux.

Chapitre deux-Article 2

Molecular analysis of *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Lebanon using four different typing methods

Article soumis dans PLoS ONE le 11 juin 2014 (N° soumission PONE-D-14-21953)

Rayane Rafei^{1,2}, Fouad Dabboussi², Monzer Hamze², Matthieu Eveillard^{1,3}, Carole Lemarié³, Marie-Pierre Gaultier³, Hassan Mallat², Rima Moghnieh⁴, Rola Husni-Samaha⁵, Marie-Laure Joly-Guillou^{1,3}, Marie Kempf^{1,3*}

¹ L'UNAM Université, Université d'Angers, Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, UPRES EA3142, Institut de Biologie en Santé – IRIS, CHU, 4, rue Larrey, 49933 Angers cedex, France.

² Laboratoire de Santé et environnement, Centre AZM pour la recherche en Biotechnologie et ses applications, Université Libanaise, Tripoli, Liban.

³ Laboratoire de Bactériologie, Institut de Biologie en Santé - PBH, CHU, 4 rue Larrey, 49933 Angers cedex, France.

⁴ Ain wa zein Hospital, shouf, Lebanon.

⁵ Division of Infectious Diseases, Department of Internal Medicine, Lebanese American University Medical Center Rizk Hospital, Beirut, Lebanon.

Introduction

Les épidémies à *A. baumannii* sont bien documentées dans la littérature internationale (Karah et al., 2012; Villegas and Hartstein, 2003; Zarrilli et al., 2013) et sont généralement dues à des souches multirésistantes aux antibiotiques et de plus en plus fréquemment par des souches résistantes aux carbapénèmes. Une meilleure connaissance de la nature de ces épidémies nécessite l'utilisation de méthodes moléculaires de typage les plus pertinentes possibles. Ces outils peuvent fournir des informations utiles pour la surveillance épidémiologique des infections, la différenciation rapide entre souches apparentées, l'identification des sources et des voies de transmission de la bactérie, la mise en place de mesures efficaces pour le contrôle des épidémies, ainsi que l'étude des populations bactériennes (Van Belkum et al., 2007).

Un grand nombre de techniques de typage avec différents degrés de résolution ont été proposés pour la caractérisation des épidémies à *A. baumannii*, comme le PFGE (Seifert et al., 2005), la rep-PCR (Higgins et al., 2010a), l'AFLP (Nemec et al., 2004a), la MLST (Bartual et al., 2005; Diancourt et al., 2010), la méthode basée sur le séquençage de 3 *loci* (3-locus sequence typing, 3-LST) (Turton et al., 2007), ou encore le *bla*_{OXA-51} Sequence Based Typing (SBT) (Hamouda et al., 2010). Le choix de la meilleure technique n'est pas toujours facile et dépend des objectifs attendus. Plusieurs auteurs insistent sur le besoin de valider les champs d'application pour chaque méthode, mais également de les harmoniser par l'intermédiaire de réseaux de référence (Grosso et al., 2011a; Zarrilli et al., 2013).

Parmi ces méthodes de typage, le PFGE reste la méthode de référence "gold standard" pour les investigations des épidémies à *A. baumannii* à petite échelle (Zarrilli et al., 2013). La MLST a un pouvoir discriminatoire moins élevé que le PFGE et elle est considérée comme la technique de référence pour les études à large échelle et pour les études de populations bactériennes. Le DiversiLab® est une forme automatisée de la rep-PCR et possède un pouvoir discriminant comparable à celui de l'électrophorèse en champ pulsé chez à *A. baumannii* (Grisold et al., 2010). Enfin, le *bla*_{OXA-51} SBT a été proposé comme une simple technique de typage générant des résultats comparables au DiversiLab® et à la MLST (Bartual et Pasteur) (Hamouda et al., 2010; Pournaras et al., 2014; Zander et al., 2012).

Le but de la présente étude est de comparer la pertinence et l'efficacité de 4 méthodes de typage d'*A. baumannii* (PFGE, DiversiLab®, MLST et *bla*_{OXA-51} SBT) à travers l'étude d'une

collection de 42 souches collectées entre les années 2009 et 2012 dans différents hôpitaux à Beyrouth et au Nord du Liban. L'objectif est également d'avoir des résultats primaires sur la distribution des clones circulants au Liban et sur les mécanismes de résistance aux carbapénèmes.

Abstract

This study analyzed 42 *Acinetobacter baumannii* strains collected between 2009-2012 from different hospitals in Beyrouth and North Lebanon to better understand the epidemiology and carbapenem resistance mechanisms in our collection and to compare the robustness of pulsed field gel electrophoresis (PFGE), multilocus sequence typing (MLST), DiversiLab (DL) and *bla*_{OXA-51} sequence-based typing (SBT). Among 31 carbapenem resistant strains, we have detected three carbapenem resistance genes: 28 carried the *bla*_{OXA-23} gene, 1 the *bla*_{OXA-24} gene and 2 strains the *bla*_{OXA-58} gene. This is the first detection of *bla*_{OXA-23} and *bla*_{OXA-24} in Lebanon. PFGE identified 11 types and was the most discriminating technique followed by DL (9 types), *bla*_{OXA-51} SBT (8 types) and MLST (7 types). The PFGE type A/ST2 was the dominant genotype in our collection present in Beyrouth and North Lebanon. The clustering agreement between all techniques was measured by adjust Wallace coefficient. An overall agreement has been demonstrated. High values of adjust Wallace coefficient were found with followed combinations: PFGE to predict MLST types = 100%, PFGE to predict *bla*_{OXA-51} SBT = 100%, *bla*_{OXA-51} SBT to predict MLST = 100%, MLST to predict *bla*_{OXA-51} SBT = 84.7%, DL to predict MLST = 81.5%, PFGE to predict DL = 69% and DL to predict *bla*_{OXA-51} SBT = 67.2%. PFGE and MLST are gold standard methods for outbreaks investigation and population structure studies respectively. Otherwise, these two techniques are technically, time and cost demanding. We recommend the use of *bla*_{OXA-51} SBT as first typing method to screen isolates and assign them to their corresponding clonal lineages. DiversiLab is a rapid tool to access outbreaks but careful interpretation of results must be always performed.

Keywords: carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii*; Lebanon, typing methods, MLST, PFGE, Diversilab, *bla*_{OXA-51} sequence-based typing

Introduction

Acinetobacter baumannii is an opportunistic gram negative pathogen involved in a wide number of nosocomial infections like ventilator-associated pneumonia, bloodstream, urinary tract, wound and meningitis infections frequently associated with a high rate of mortality and morbidity [1]. Outbreaks have been intensively documented worldwide and are usually caused by multidrug resistant strains and more and more carbapenem resistant strains [2,3]. These outbreaks strains mainly belonged to three international clones I, II and III (previously called as European clones [4,5]), but also to different clonal lineages. Karah *et al.* [2] analyzed the MLST-based global population structure of *A. baumannii* on 496 isolates. They showed the presence of 26 clones and among them, 18 were international clones and 8 European or Asian restricted clones. The International clone II was the major clone reported in 34 countries in Europe, Asia, Africa Australia, USA, and South America.

To track and monitor these outbreaks, denote strain relatedness and assign an outbreak strain to its corresponding clonal lineage, many typing methods with different intrinsic degrees of resolution are proposed [3] such as pulsed field gel electrophoresis (PFGE) [6], repetitive-sequence-based PCR (rep-PCR) [7], amplified fragment length polymorphism (AFLP) [8], multilocus sequence typing (MLST) [9,10], 3-locus sequence typing (3-LST) [11], *bla*_{OXA-51} sequence-based typing (SBT) [12] or Multiple-Locus Variable number of tandem repeat Analysis (MLVA) [13]. Selection of an appropriate genotyping technique is not always easy and depends to the studied objectives. Many authors emphasized the great need to validate the application of each method as well as to harmonize different typing methods by reference networks [3,14]. Among these methods, PFGE is still considered the current gold standard for *A. baumannii* outbreak investigation at local scale [3]. MLST has a discriminatory power lesser than PFGE and is regarded as the gold standard for large epidemiological and population structure studies. For *A. baumannii*, two MLST schemes have

been proposed: Bartual's MLST [9] and Pasteur's MLST [10]. DiversiLab (DL) is a semi-automated form of rep-PCR with a comparable discriminatory power to PFGE [15]. The identification of eight international clones is one of the remarkable advantages of this system [7]. *bla*_{OXA-51} SBT has been proposed as a single-locus based typing [12] with a similar discriminatory power to DL [16] and Bartual and Pasteur's MLST [12,17].

In Lebanon, there have been limited reports studying only local outbreaks in Beyrouth between 2004 and 2007 where *bla*_{OXA-58} was the only carbapenem resistance gene identified [18–20]. Recently, we have detected four *bla*_{NDM-1} producing *A. baumannii* isolated in Tripoli, Northern Lebanon from Syrian civilians wounded during Syrian war [21].

The present study has a double aim: firstly to compare the performance and effectiveness of four epidemiological typing methods (PFGE, DiversiLab, MLST and *bla*_{OXA-51-like} SBT), and secondary to get primary results on circulating clones and carbapenem resistance mechanisms in Lebanon by analysis of 42 non duplicate strains conserved on Azm center for research on biotechnology and its application (Lebanese university) and collected between 2006-2012 from different hospitals in Beyrouth and North Lebanon.

Results

Identification

Forty-two strains were confirmed as *A. baumannii* by molecular techniques. These strains were isolated in different hospitals in Beyrouth (24 strains) and North Lebanon (18 strains) from various clinical specimens between 2009 and 2012 except one strain isolated in 2006 (Table 1). Beyrouth strains were isolated during epidemiological contexts.

Carbapenem resistance mechanisms

Thirty-one strains showed carbapenem resistance phenotypes (Figure 1). Among these strains, 28 harbored a *bla*_{OXA-23} gene, 2 a *bla*_{OXA-58} gene, and one a *bla*_{OXA-24} gene. No acquired *bla*_{ndm-1} or *bla*_{OXA-143} has been detected. *ISAbal* was present in 37 strains. All carbapenem resistant

strains except one (strain 53, *bla*_{OXA-24} positive) had this sequence in their genomes whereas 7 carbapenem susceptible strains only had this sequence. The research of *ISAbal* presence before both *bla*_{OXA-51} and *bla*_{OXA-23} genes revealed its insertion upstream *bla*_{OXA-23} but not upstream *bla*_{OXA-51} gene. This insertion explains the high level of resistance to carbapenems (imipenem MIC>32, meropenem MIC>32, doripenem 12<MIC>32) for all *bla*_{OXA-23} producing *A. baumannii* strains. The *bla*_{OXA-24}-producing strain (strain 53) had MIC: 8 mg/l, 16 mg/l, 16 mg/l for imipenem, meropenem and doripenem respectively, whereas the two *bla*_{OXA-58} - producing strains (strain 58 and 23) showed low level of carbapenem resistance: (4; 8 mg/l), (2; 4 mg/l), (2; 3 mg/l) for imipenem, meropenem and doripenem respectively.

Epidemiological typing

- PFGE

Using $\geq 80\%$ similarity cut-off as a threshold, PFGE classified our strains in 11 types: 4 clusters (A' to D') and 7 unique profiles (Figure 1). Cluster A' comprised 28 strains, 27 were *bla*_{OXA-23} producing strains and one an imipenem susceptible strain. This cluster contained strains from Beyrouth and North Lebanon. Cluster B' contained two *bla*_{OXA-58} producing strains that belonged to the same hospital. Cluster C' and D' contained two and three imipenem susceptible strains respectively.

- MLST

MLST typing was performed on all strains. Seven ST(s) were identified (Figure 1), two of which were novel and assigned as 284 and 285 by MLST Pasteur. The ST2 was the most predominant, present in 34 strains, followed by ST25, present in 3 strains; other ST(s) were present sporadically in our collection. The eBUSRT analysis of our ST(s) with all identified ST(s) in MLST database (28.03.2014) showed that ST 1, 2, 3, 25, 284 belonged to CC 1, 2, 3, 25 and 33 respectively, whereas ST285 was a singleton, and ST108 shared similarity with

ST112 (we did not assign a name for this complex because no more of 2 ST(s) have been yet identified). Interestingly, our novel ST284 was a SLV of ST33 (the founder of CC33).

- DiversiLab

Using $\geq 95\%$ similarity cut-off as a threshold, DiversiLab identified 9 types (Figure 1): 3 clusters (cluster A to C) and 6 unique profiles (ungrouped strains). Cluster A was the major cluster which contained 31 strains, whereas cluster B and C contained 2 and 3 strains respectively. Cluster A grouped only strains belonging to clone EU II except one strain (strain 62) belonging to EU clone III. This cluster comprised strains from different hospitals in Beyrouth (22 strains) and from North Lebanon (9 strains). Cluster B comprised two imipenem susceptible strains from Tripoli and Beyrouth, while cluster C contained all strains belonging to ST25 and coming from one hospital in Tripoli. Two unclustered strains belonged to ST2 while the remaining strains belonged to different ST(s).

- *bla*_{OXA-51-like} sequence-based typing

*bla*_{OXA-51} SBT has been performed with randomly selected strains from DL type A, and for all remaining strains. Notably, *bla*_{OXA-51} SBT correctly identified our strains. All strains belonging to ST2 (CC2) carried the *bla*_{OXA-66} gene, except one strain (strain 17) which was a colistin resistant one and which carried a single amino acid variant of OXA-66 described for the first time in this study (OXA-336, KF048907). The *bla*_{OXA-336} had a non-synonymous mutation from *bla*_{OXA-66} at nucleotide 518 (thymine became adenine) which led to the substitution of isoleucine by asparagine at amino acid 173. For the other strains, each ST had a unique OXA-51 type: ST1 carried OXA-69, ST3 OXA-71, ST25 OXA-64, ST108 OXA-132, ST284 OXA-120, and ST285 a new OXA (OXA-337, KF048908).

Comparison of the four typing methods

The visual analysis of the collection (Figure 1) showed an overall agreement between the different techniques, although some discrepancies have been noticed. The adjusted Wallace

coefficient analysis (Table 3) revealed that all ST(s) obtained by MLST were predicted at 100% level by PFGE and *bla*_{OXA-51} SBT and at 81.5% by DL. Conversely, MLST was unable to predict PFGE and DL types, but able to well predict *bla*_{OXA-51} sequences (84.7%). As expected, PFGE types were not predicted by any other technique. In contrast, PFGE predicted at 100% level all ST(s) and *bla*_{OXA-51} sequences and at 69% DL types. DL types were well predicted (69.0%) by PFGE, but not predicted neither by MLST nor by *bla*_{OXA-51} SBT. In contrast, DL predicted the ST(s) at 81.5% and *bla*_{OXA-51} at 67.2% but was unable to predict PFGE types. Finally for *bla*_{OXA-51} SBT, we have assumed that isolates belonging to ST2 and for which we didn't perform *bla*_{OXA-51} sequencing carried *bla*_{OXA-66} [17]. *bla*_{OXA-51} sequences were all predicted by PFGE, and at 84.7% and 67.2% by MLST and DL respectively. Conversely *bla*_{OXA-51} SBT was able to predict all ST(s), but not PFGE and DL types.

Discussion

This is the first study in Lebanon providing data about clonality and carbapenem resistance mechanisms of a set of isolates recovered from different hospitals in Beyrouth and North Lebanon. However, this study does not illustrate the overall *A. baumannii* molecular epidemiology in this country because it does not contain prospectively collected isolates from different hospitals in different Lebanese provinces.

Currently, worldwide carbapenem resistant strains are mostly associated with international clone 2 [2], with *bla*_{OXA-23} as the main carbapenem resistance mechanism [28–30]. Our results stick well to the global situation where the majority of carbapenem resistant strains belonged to ST2, but only two imipenem resistant strains in our collection belonged to ST1 and ST285. In addition, a single PFGE type A'/ST2 dominated heavily in Beyrouth and North Lebanon and could be an epidemic cluster. In several countries, *bla*_{OXA-58} [31] or *bla*_{OXA-24} [32] have been progressively replaced by *bla*_{OXA-23}. In Beyrouth-Lebanon, the studied outbreaks between 2004-2007 [18–20] were caused by the three international clones

(1 to 3) producing OXA-58 as a main carbapenem resistance mechanism. In the present study, we detected *bla*_{OXA-58} in two strains from a hospital in Beyrouth, but *bla*_{OXA-23} seemed to be an emerging carbapenemase in Beyrouth and North Lebanon as else. It is noteworthy that we reported in this study the first detection of *bla*_{OXA-23} and *bla*_{OXA-24} in Lebanon.

Our *A. baumannii* strains were analyzed using four epidemiological typing techniques. PFGE was the most discriminating scheme allowing the recognition of 11 types, followed by DiversiLab with 9 types then *bla*_{OXA-51} with 8 types and finally MLST with 7 types.

To our knowledge, there is no sufficient use of adjusted Wallace coefficient in *A. baumannii* typing field, an area which has largely been expanded in the last decades. Many techniques have been proposed with an increasing trend to track this pathogen and assign it to its corresponding international clonal lineage. Therefore, there is an arising need to perform a quantitative comparison between available typing methods using this coefficient or other coefficients to assess their strengths and weaknesses, better understand and validate their fields of application.

PFGE has been considered as a gold standard for outbreak investigations due to its higher discriminatory power which impaired its use for large investigations and population structure studies. As we have shown, PFGE is a very good method to predict *bla*_{OXA-51}, MLST and DL types, but its higher resolution prevents other methods to successfully predict its types. Indeed, PFGE is a time demanding and labor intensive method with many intra and inter laboratory reproducibility problems [33]. *ApaI*, the classical restriction enzyme used for almost *A. baumannii* PFGE protocols generates complex DNA patterns with more than 40 fragments [34]. Chang *et al.*, 2013 [34] suggested the use of two other infrequent cutting restriction enzymes (*AscI* and *AsiSI*) generating clear patterns with only 10-20 fragments per pattern.

MLST is a highly informative technique which puts isolates in a global context [30] and can directly assign them to their clonal complex. Thus, it is regarded as the method of choice for long term and phylogenetic studies. Although it is a reproducible and portable method, MLST is expensive and time demanding. As expected, MLST was unable to predict PFGE and DL types because of a discriminatory power lesser than found in PFGE and rep-PCR [12,30]. Besides, MLST could predict very well (84.7%) all *bla*_{OXA-51} sequences except the colistin resistant strain that belonged to ST2 and had an OXA-336, a single amino acid variant of OXA-66 enzyme.

DiversiLab is a commercial rep-PCR typing system which benefits from several advantages: rapidity with an ability to investigate large number of isolates, standardization, reproducibility with conserved clustering between laboratories [35], and allowing in house libraries building. For *A. baumannii*, DL had revealed a comparable discriminatory power to PFGE [15]. It has been suggested to study *A. baumannii* population structure with DL as it can identify eight international clones within 492 isolates from a worldwide collection [7] and generate concordant results with MLST and *bla*_{OXA-51} SBT [16, 36]. Our DL results showed an overall agreement with PFGE, whenever some exceptions (figure 1) have been noticed which explained the low adjust Wallace coefficient (PFGE predicted 69% of DL types). Compared to PFGE clustering, DL grouped differently some strains belonging to the same PFGE type or assembled some strains belonging to different PFGE types in the same DL types, as reported with some other authors [27,37]. One discrepant result was the strain belonging to ST3 which regrouped with DL type A, whereas it had a unique PFGE type. When we visually checked the graphs of samples and overlaid functions, we noticed the presence of another peak which was the source of this confusion between strains belonging ST2/DL type A and strain ST3/DL type A. Hence, this noticed the importance of careful interpretation of DL results [37].

The *bla*_{OXA-51} gene is an intrinsic chromosomal beta-lactamase gene naturally found in *A. baumannii* and up to 95 enzyme variants have been identified to date [38]. Sequencing of the entire gene was proposed as a *bla*_{OXA-51} SBT [12]. This SBT could correctly identify the eight international clones characterized by DL [16]. Also, it correlated well with Bartual's MLST [12]. Compared with Pasteur's MLST, SBT could correctly assign the nine clonal complexes in such manner each CC had specific *bla*_{OXA-51} alleles [17]. We have found similar results, where each CC or ST had a specific *bla*_{OXA-51} variant confirmed by adjusted Wallace coefficient (*bla*_{OXA-51} SBT predict 100% all ST). Indeed, the colistin strain (strain 17) carried OXA-336 which differed only by a single amino acid from OXA-66, indicating that *bla*_{OXA-51} SBT could correctly identify it as belonging to CC2.

Conclusion

This report describes the first detection of *bla*_{OXA-23} and *bla*_{OXA-24} in Lebanon. Although, our collection is unable to give the real picture of molecular epidemiology in Lebanon, it shed lights on circulating clones and on the mechanisms of carbapenem resistance. Other multi center studies are obviously required to better understand the epidemiology of this bug in the country.

Overall, a good concordance with the four typing methods was shown. PFGE and MLST are reference methods in local and long term epidemiological studies respectively, although both methods are time and cost consuming. *bla*_{OXA-51} SBT seems to be an excellent choice for initial epidemiological screening of isolates. DL is a rapid tool to access outbreaks at local scale but careful interpretation of results must be done.

Materials and Methods

Bacterial strains

A total of 42 non redundant clinical strains of *A. baumannii* isolated from various clinical samples were collected between 2006 and 2012. All of these strains were collected from

hospitals in Beyrouth (24 strains) and North Lebanon (18 strains). The clinical sources of the different strains are noted in Table 1.

Identification

Isolates were routinely cultured on Blood agar at 37°C, and stored at -80°C until further study. Identification to *A. calcoaceticus-baumannii* complex was initially performed using MALDI-TOF Vitek® MS (bioMérieux®, Marcy-l'Etoile, France) and confirmation of identification at species level was done by real time PCR of *bla*_{OXA-51} gene [22] and partial RNA polymerase b-subunit (*rpoB*) gene sequencing [23]

Susceptibility testing and investigation of carbapenem resistance mechanisms

Antibiotic Susceptibility testing was determined by the disc diffusion method according to the guidelines of the French Society of Microbiology (www.sfm-microbiologie.org/). Resistance to carbapenem and colistin were confirmed by determining imipenem, meropenem, doripenem and colistin minimum inhibitory concentration (MICs) by Etest® strips (bioMérieux®, Marcy-l'Étoile, France). Carbapenem resistant isolates were investigated for the presence of carbapenem resistance genes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{OXA-143}, *bla*_{ndm-1} by PCR (Table 2). Presence of the insertion sequence *ISAbal* was also screened. The association *ISAbal-bla*_{OXA-23} and *ISAbal-bla*_{OXA-51} was tested using a combination of primers *ISAbalF* with reverse primers targeting *bla*_{OXA-23} or *bla*_{OXA-51} respectively (Table 2).

Epidemiological typing

- Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)

PFGE using *ApaI* as a restriction enzyme was done as described previously [24]. DNA fragments were separated in CHEF-DR® III system (Biorad, Marne LA Coquette, France) at 6V/cm and 14°C for 21 hours with pulse times ranging from 3s to 20s. Computer-assisted analysis was performed by using fingerprinting II (Biorad, Marne LA Coquette, France) with the unweighted pair-group method with arithmetic averages (UPGMA) and Dice similarity

coefficient for banding pattern comparison. A PFGE type was defined by a cluster of isolates showing $\geq 80\%$ similarity

- *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 by an ABI 3130XL DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, United States). The sequences were compared to the available sequences present in the MLST website. When a new allele or ST was identified, it was submitted and codified by Institut Pasteur MLST Database. The eBURST [25] was used to compare ST to the existed ST(s) and to assign isolates to their clonal complexes. A clonal complex (CC) is defined as a set of similar ST(s) having 6 identical loci among 7, so a CC is formed by the founder ST and its single locus variants (SLV) [10].

- *DiversiLab (DL)*

Rep-PCR was performed using the automated system DiversiLabTM, version 3.4 (bioMérieux[®], Marcy-l'Étoile, France) following the manufacturer recommendations. Briefly, bacteria were cultured on sheep blood agar (Oxoid). DNA was extracted using the MoBio Ultra CleanTM microbial DNA extraction Kit, and adjusted to 50 ng/ μ l. After extraction, DNA was amplified using DiversiLab *Acinetobacter* kit, and the amplified DNA was separated and detected by Agilent[®] 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies). The resulted fingerprints were analyzed using the DiversiLab software with the modified Kullback-Leibler (KL) as a statistical method and $\geq 95\%$ as a threshold to define a cluster of closely related isolates or a DL type.

- *bla_{OXA-51} sequence-based typing (SBT)*

This typing method consists to sequence the full length (825 bp) of a single locus *bla_{OXA-51}* gene. The *bla_{OXA-51}* was amplified by external primers OXA-69A/OXA-69B as described [12]. PCR products were purified and sequenced by ABI 3130xl DNA sequencer (Applied Biosystems). The resulted sequences were compared to all variants present in BLAST. When a novel variant was detected, it was submitted to GenBank and assigned by the Lahey database for beta-lactamase classification (<http://www.lahey.org/studies/webt.asp>).

Concordance between techniques

The online tool (<http://www.comparingpartitions.info/>) was used to calculate the adjusted Wallace coefficient. This coefficient is an objective and quantitative measure of clustering agreement between the studied techniques which indicates the probability of a pair of isolates assigned at the same type by one technique is also reassigned at the same by the other technique [26,27].

Nucleotide sequence accession numbers and novel sequence types

Two new nucleotide sequences of *bla_{OXA-51}* were submitted to GenBank under accession number KF048907 and KF048908 and assigned respectively by Lahey center as *bla_{OXA-336}* and *bla_{OXA-337}*. Two new sequence types were identified and coded by MLST Pasteur as ST284 (3-5-2-1-7-1-4) and ST285 (1-52-2-2-9-4-2). The latter had a new *fusA* allele.

Ethic statement

Not applicable

Acknowledgments

We thank the team of the curators of the Institut Pasteur MLST system (Paris, France) for importing novel alleles, profiles and isolates at <http://www.pasteur.fr/mlst>. We thank also Catherine Ramont, Mariam Yehya and Taha Abdo for excellent technical assistance. A part of

results of carbapenemase detection was presented at the 9th International Symposium on the Biology of *Acinetobacter*, Cologne 2013, poster presentation P5-7.

Author contributions

Conceived and designed the experiments: MK, MLJG, ME, FD, MH. Performed the experiments: RR, CL, MPG. Analyzed the data: MK, MLJG, CL, RR, MPG. Contributed reagents/strains/materials: FD, MH, HM, RM, RHS. Wrote the paper: RR, MK, MLJG, ME.

References

1. Kempf M, Rolain JM (2012) Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. *Int J Antimicrob Agents* 39: 105–114. doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.10.004.
2. Karah N, Sundsfjord A, Towner K, Samuelsen Ø (2012) Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii*. *Drug Resist Updat* 15: 237–247. doi:10.1016/j.drug.2012.06.001.
3. Zarrilli R, Pournaras S, Giannouli M, Tsakris A (2013) Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. *Int J Antimicrob Agents* 41: 11–19. doi:10.1016/j.ijantimicag.2012.09.008.
4. Dijkshoorn L, Aucken H, Gerner-Smidt P, Janssen P, Kaufmann ME, et al. (1996) Comparison of outbreak and nonoutbreak *Acinetobacter baumannii* strains by genotypic and phenotypic methods. *J Clin Microbiol* 34: 1519–1525.
5. Van Dessel H, Dijkshoorn L, Van Der Reijden T, Bakker N, Paauw A, et al. (2004) Identification of a new geographically widespread multiresistant *Acinetobacter baumannii* clone from European hospitals. *Res Microbiol* 155: 105–112.
6. Seifert H, Dolzani L, Bressan R, van der Reijden T, van Strijen B, et al. (2005) Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel

- electrophoresis-generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol 43: 4328–4335. doi:10.1128/JCM.43.9.4328-4335.2005.
7. Higgins PG, Dammhayn C, Hackel M, Seifert H (2010) Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother 65: 233–238. doi:10.1093/jac/dkp428.
 8. Nemec A, Dijkshoorn L, van der Reijden TJ (2004) Long-term predominance of two pan-European clones among multi-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in the Czech Republic. J Med Microbiol 53: 147.
 9. Bartual SG, Seifert H, Hippler C, Luzon MA, Wisplinghoff H, et al. (2005) Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol 43: 4382–4390. doi:10.1128/JCM.43.9.4382-4390.2005.
 10. Diancourt L, Passet V, Nemec A, Dijkshoorn L, Brisse S (2010) The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. PLoS ONE 5: e10034. doi:10.1371/journal.pone.0010034.
 11. Turton JF, Gabriel S, Valderrey C, Kaufmann ME, Pitt TL (2007) Use of sequence-based typing and multiplex PCR to identify clonal lineages of outbreak strains of *Acinetobacter baumannii*. Clin Microbiol Infect 13: 807–815.
 12. Hamouda A, Evans BA, Towner KJ, Amyes SG (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.
 13. Pourcel C, Minandri F, Hauck Y, D'Arezzo S, Imperi F, et al. (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. doi:10.1128/JCM.02003-10.
14. Grosso F, Carvalho KR, Quinteira S, Ramos A, Carvalho-Assef AP, et al. (2011) OXA-23-producing *Acinetobacter Baumannii*: a new hotspot of diversity in Rio De Janeiro? J Antimicrob Chemother 66: 62–65. doi:10.1093/jac/dkq406.
 15. Grisold AJ, Zarfel G, Strenger V, Feierl G, Leitner E, et al. (2010) Use of automated repetitive-sequence-based PCR for rapid laboratory confirmation of nosocomial outbreaks. J Infect 60: 44–51.
 16. Zander E, Nemec A, Seifert H, Higgins PG (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. doi:10.1128/JCM.06462-11.
 17. Pournaras S, Gogou V, Giannouli M, Dimitroulia E, Dafopoulou K, et al. (2014) Single locus sequence-based typing of *bla*_{OXA-51-like} gene for rapid classification of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates to international clones. J Clin Microbiol. doi:10.1128/JCM.03565-13.
 18. Zarrilli R, Vitale D, Di Popolo A, Bagattini M, Daoud Z, et al. (2008) A plasmid-borne *bla*_{OXA-58} gene confers imipenem resistance to *Acinetobacter baumannii* isolates from a Lebanese hospital. Antimicrob Agents Chemother 52: 4115–4120. doi:10.1128/AAC.00366-08.
 19. Giannouli M, Tomasone F, Agodi A, Vahaboglu H, Daoud Z, et al. (2009) Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in intensive care units of multiple Mediterranean hospitals. J Antimicrob Chemother 63: 828–830. doi:10.1093/jac/dkp032.
 20. Di Popolo A, Giannouli M, Triassi M, Brisse S, 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 17: 197–201. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03254.x.
21. Rafei R, Dabboussi F, Hamze M, Eveillard M, Lemarié C, et al. (2014) First report of *bla*_{NDM-1}-producing *Acinetobacter baumannii* isolated in Lebanon from civilians wounded during the Syrian war. Int J Infect Dis 21: 21–23. doi:10.1016/j.ijid.2014.01.004.
 22. Kempf M, Rolain JM, Diatta G, Azza S, Samb B, et al. (2012) 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.
 23. Gundi VA, Dijkshoorn L, Burignat S, Raoult D, 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. doi:10.1099/mic.0.026054-0.
 24. Kempf M, Rolain JM, Azza S, Diene S, Joly-Guillou ML, et al. (2012) Investigation of *Acinetobacter baumannii* resistance to carbapenems in Marseille hospitals, south of France: a transition from an epidemic to an endemic situation. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand. doi:10.1111/j.1600-0463.2012.02935.x.
 25. Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, Spratt BG (2004) eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. J Bacteriol 186: 1518–1530.
 26. Severiano A, Pinto FR, Ramirez M, Carrico JA (2011) Adjusted Wallace Coefficient as a measure of congruence between typing methods. J Clin Microbiol 49: 3997–4000. doi:10.1128/JCM.00624-11.
 27. Maâtallah M, Bakhrouf A, Habeeb MA, Turlej-Rogacka A, Iversen A, et al. (2013) Four genotyping schemes for phylogenetic analysis of *Pseudomonas aeruginosa*: comparison

- of their congruence with multi-locus sequence typing. PLoS ONE 8: e82069. doi:10.1371/journal.pone.0082069.
28. Adams-Haduch JM, Onuoha EO, Bogdanovich T, Tian GB, Marschall J, et al. (2011) Molecular epidemiology of carbapenem-nonsusceptible *Acinetobacter baumannii* in the United States. J Clin Microbiol 49: 3849–3854. doi:10.1128/JCM.00619-11.
 29. Schleicher X, Higgins PG, Wisplinghoff H, Körber-Irrgang B, Kresken M, et al. (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.
 30. Runnegar N, Sidjabat H, Goh HM, Nimmo GR, Schembri MA, et al. (2010) Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a single institution over a 10-year period. J Clin Microbiol 48: 4051–4056. doi:10.1128/JCM.01208-10.
 31. Minandri F, D'Arezzo S, Antunes LCS, Pourcel C, Principe L, et al. (2012) Evidence of diversity among epidemiologically related carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* strains belonging to international clonal lineage II. J Clin Microbiol 50: 590–597. doi:10.1128/JCM.05555-11.
 32. Grosso F, Quinteira S, Peixe L (2011) Understanding the dynamics of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* lineages within Portugal. Clin Microbiol Infect Dis 17: 1275–1279. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03469.x.
 33. Li W, Raoult D, Fournier PE (2009) Bacterial strain typing in the genomic era. FEMS Microbiol Rev 33: 892–916. doi:10.1111/j.1574-6976.2009.00182.x.
 34. Chang KM, Huang WC, Chiou CS, Shen GH, Huang CC, et al. (2013) Suitable restriction enzyme for standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocol and interlaboratory comparison of *Acinetobacter baumannii*. J Microbiol Immunol Infect 46: 195–201. doi:10.1016/j.jmii.2012.05.011.

35. Higgins PG, Hujer AM, Hujer KM, Bonomo RA, Seifert H (2012) Interlaboratory reproducibility of DiversiLab rep-PCR typing and clustering of *Acinetobacter baumannii* isolates. *J Med Microbiol* 61: 137–141. doi:10.1099/jmm.0.036046-0.
36. Higgins PG, Janssen K, Fresen MM, Wisplinghoff H, 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. doi:10.1128/JCM.01759-12.
37. Schuetz AN, Huard RC, Eshoo MW, Massire C, Della-Latta P, et al. (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. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2011.09.012.
38. Evans BA, Amyes SG (2014) OXA β -Lactamases. *Clin Microbiol Rev* 27: 241–263. doi:10.1128/CMR.00117-13.
39. Mesli E, Berrazeg M, Drissi M, Bekkhoucha SN, Rolain JM (2013) Prevalence of carbapenemase-encoding genes including New Delhi metallo- β -lactamase in *Acinetobacter* species, Algeria. *Int J Infect Dis* 17: e739–e743. doi:10.1016/j.ijid.2013.02.024.
40. Higgins PG, Lehmann M, Seifert H (2010) Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents* 35: 305. doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.10.014.
41. Bonnin RA, Naas T, Poirel L, Nordmann P (2012) Phenotypic, biochemical, and molecular techniques for detection of Metallo- β -Lactamase NDM in *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 50: 1419–1421. doi:10.1128/JCM.06276-11.

42. Ruiz M, Marti S, Fernandez-Cuenca F, Pascual A, Vila J (2007) Prevalence of IS(Aba1) in epidemiologically unrelated *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. Clin Microbiol Infect Dis 13: 1192–1198.

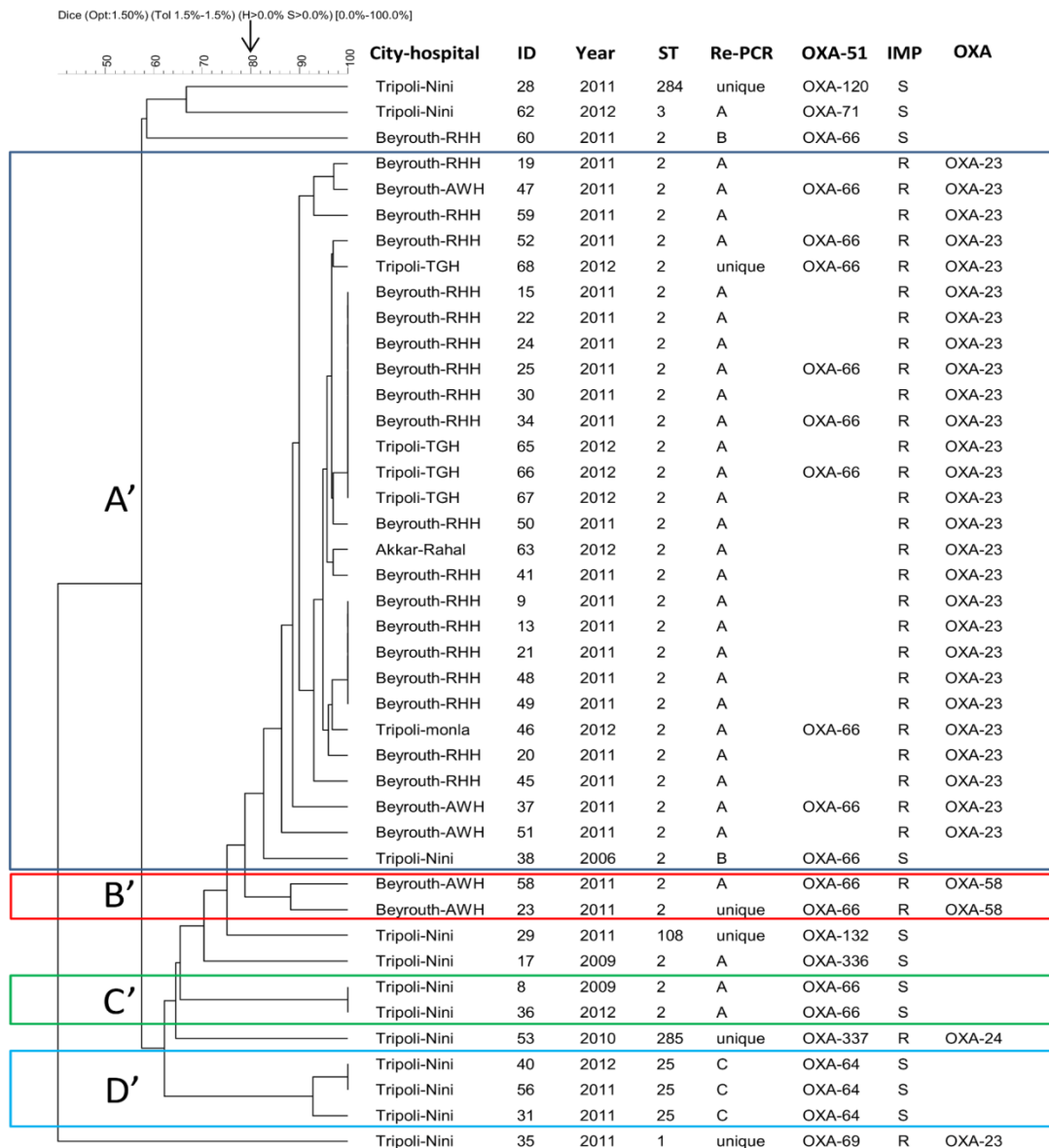


Figure 1: PFGE, MLST, DiversiLab and *bla*_{OXA-51-like} comparison results for 42 *A. baumannii* strains.

Dendrogram was generated by cluster analysis of PFGE fingerprinting patterns. Arrow shows the adopted cut-off (80%) for definition of PFGE type. ID: Sample number, rep-PCR for rep-PCR type, IMP: imipenem susceptibility (S for susceptible and R for resistant), OXA: oxacillinase responsible for carbapenem resistance phenotype.

Table 1: Origin and repartition of strains used in this study.

Strain ID	Hospital	City	Department	Gender	Age	Period study	Sample origin
8	Nini	Tripoli	ICU	M	70	2009	tracheal aspirate
9	RHH	Beyrouth	ICU	M	79	2011	blood
13	RHH	Beyrouth	NA	NA	NA	2011	NA
15	RHH	Beyrouth	ICU	M	68	2011	blood
17	Nini	Tripoli	Cardiology	M	48	2009	urine
19	RHH	Beyrouth	NA	NA	NA	2011	NA
20	RHH	Beyrouth	ICU	F	69	2011	blood
21	RHH	Beyrouth	NA	NA	NA	2011	NA
22	RHH	Beyrouth	NA	NA	NA	2011	NA
23	AWH	Beyrouth	NA	M	89	2011	Rectum

Partie expérimentale-Chapitre deux

24	RHH	Beyrouth	ICU	M	54	2011	Blood
25	RHH	Beyrouth	NA	NA	NA	2011	NA
28	Nini	Tripoli	NA	M	NA	2011	Urine
29	Nini	Tripoli	NA	F	22	2011	Urine
30	RHH	Beyrouth	NA	NA	NA	2011	NA
31	Nini	Tripoli	ICU	M	72	2011	tracheal aspirate
34	RHH	Beyrouth	NA	NA	NA	2011	NA
35	Nini	Tripoli	Outpatient	M	NA	2011	Bedsore
36	Nini	Tripoli	ICU	M	74	2012	tracheal aspirate
37	AWH	Beyrouth	NA	M	89	2011	Throat
38	Nini	Tripoli	NA	M	NA	2006	tracheal aspirate
40	Nini	Tripoli	ICU	M	20	2012	Blood

Partie expérimentale-Chapitre deux

41	RHH	Beyrouth	NA	NA	NA	2011	NA
45	RHH	Beyrouth	NA	NA	NA	2011	NA
46	Monla	Tripoli	NA	M	37	2012	chest drain
47	AWH	Beyrouth	NA	F	65	2011	Sputum
48	RHH	Beyrouth	NA	M	74	2011	Blood
49	RHH	Beyrouth	NA	NA	NA	2011	NA
50	RHH	Beyrouth	NA	NA	NA	2011	NA
51	RHH	Beyrouth	NA	NA	NA	2011	NA
52	RHH	Beyrouth	NA	NA	NA	2011	NA
53	Nini	Tripoli	Maternity	F	25	2010	Urine
56	Nini	Tripoli	ICU	F	79	2011	bronchial aspirate
58	AWH	Beyrouth	NA	F	39	2011	Sputum

Partie expérimentale-Chapitre deux

59	RHH	Beyrouth	NA	F	70	2011	Blood
60	RHH	Beyrouth	NA	NA	NA	2011	NA
62	Nini	Tripoli	Outpatient	F	74	2012	Urine
63	Rahal	Akkar	NA	M	46	2012	Wound
65	TGH	Tripoli	NA	M	27	2012	Wound
66	TGH	Tripoli	ICU	M	29	2012	Sputum
67	TGH	Tripoli	NA	F	38	2012	Abdomen
68	TGH	Tripoli	NA	M	29	2012	Sputum

AWH: Ain Wazein Hospital; RHH: Rafic Hariri Hospital; TGH: Tripoli Governmental Hospital; ICU: Intensive care unit; NA: not available

Table 2: Oligonucleotide primers and TaqMan* fluorescent probes used in this study

Gene	Primer	Primer Sequences	Amplicon size (bp)	References
bla _{OXA51-like}	OXA51like-F	5'-AACATTAAGCACTCTTACTTATAAC	171	[22]
	OXA51like-R	5'-TTGTTGGATAACTAAAACACCCGT		
	OXA51like-Dye	FAM-CTCACCTTATATAGTGTCTGCTAA-BHQ1		
bla _{OXA23-like}	OXA23-F1	5'-TGCTCTAAGCCGCGCAAATA	130	[39]
	OXA23-R1	5'-TGACCTTTTCTCGCCCTTCC		
	OXA23-probe	FAM-GCCCTGATCGGATTGGAGAACCA-BHQ1		
bla _{OXA24-like}	OXA24-F	5'-CAAATGAGATTTTCAAATGGGATGG	123	[39]
	OXA24-R	5'-TCCGTCTTGCAAGCTCTTGAT		
	OXA24-probe	FAM-GGTGAGGCAATGGCATTGTCAGCA-BHQ1		
bla _{OXA58-like}	OXA58-F	5'-CGCAGAGGGGAGAATCGTCT	102	[39]
	OXA58-R	5'-TTGCCCATCTGCCTTTTCAA		
	OXA58-probe	FAM-GGGGAATGGCTGTAGACCCGC- BHQ1		
bla _{OXA143-like}	OXA-143-F	5'-TGGCACTTTCAGCAGTTCCT	149	[40]
	OXA-143-R	5'-TAATCTTGAGGGGGCCAACC		

<i>bla</i> NDM	NDM-F	5'-GGTGCATGCCCGGTGAAATC	661	[41]
	NDM-R	5'-ATGCTGGCCTTGGGGAACG		
ISAba1	ISAba1	5'-CATTGGCATTAAACTGAGGAGAAA	451	[42]
	ISAba2	5'-TTGGAAATGGGGAAAACGAA		
<i>bla</i> _{OXA51-like}	OXA-69A	5'-CTAATAATTGATCTACTCAAG	975	[12]
	OXA-69B	5'-CCAGTGGATGGATGGATAGATTATC		
<i>rpoB</i>	Ac696F	5'-TAYCGYAAAGAYTTGAAAGAAG	350	[23]
	Ac1093R	5'-CMACACCYTTGTTMCCRTGA		

* Eurofins MWG Operon, Courtaboeuf, France

Table 3: Concordance between the studied typing techniques using adjusted Wallace coefficient (95% confidence interval)

	PFGE (cut-off 80%)	DL (cut-off 95%)	MLST	bla_{OXA-51} SBT
PFGE		0.690 (0.313-1.000)	1.000 (1.000-1.000)	1.000 (1.000-1.000)
DL	0.462 (0.086-0.838)		0.815 (0.473-1.000)	0.672 (0.259-1.000)
MLST	0.422 (0.058-0.786)	0.513 (0.107-0.919)		0.847 (0.564-1.000)
bla_{OXA-51} SBT	0.498 (0.142-0.854)	0.499 (0.085-0.914)	1.000 (1.000-1.000)	

Commentaires

Les résultats de sensibilité aux antibiotiques ont montré que sur les 42 souches analysées, 31 étaient résistantes aux carbapénèmes. Parmi ces souches, 28 possédaient le gène *bla*_{OXA-23-like}, une souche possédait le gène *bla*_{OXA-24-like} et 2 souches possédaient le gène *bla*_{OXA-58-like}. Cette étude est la première rapportant la détection chez *A. baumannii* des gènes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24} au Liban.

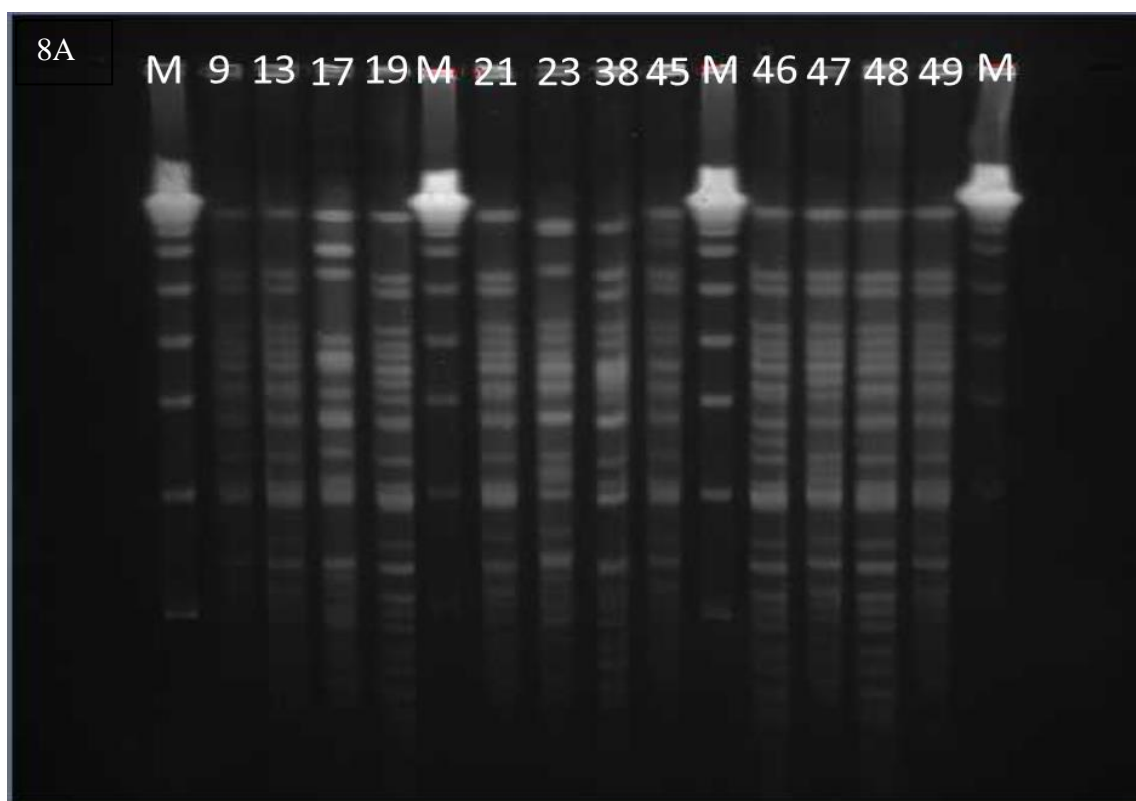
Concernant les résultats des typages moléculaires des souches, nous avons montré que le PFGE était la technique la plus discriminante, permettant l'identification de 11 types différents, suivie par la technologie DiversiLab® (9 types), le *bla*_{OXA-51} SBT (8 types) et enfin la MLST (7 types). Le ST2 était le clone dominant dans notre collection présent à la fois à Beyrouth et à Tripoli, ce qui est concordant avec les observations faites dans la littérature.

La concordance entre les techniques de typage a été mesurée par le coefficient de Wallace ajusté "adjusted Wallace coefficient" et les résultats ont montré des coefficients de concordance de 42 % à 100 % selon les méthodes.

Les techniques de typage par PFGE et MLST sont les méthodes de référence pour les investigations des épidémies et les études de la structure de population respectivement. Toutefois, ces deux techniques sont fastidieuses et coûteuses. La technique *bla*_{OXA-51} SBT est une technique plus simple, permettant un dépistage initial et rapide des isolats et leur attribution à leurs clones correspondants. DiversiLab® est une technique rapide, mais une interprétation experte des résultats doit être effectuée.

Le choix d'une enzyme de restriction est un élément clé pour la standardisation d'un protocole d'électrophorèse en champ pulsé, elle a un impact critique sur l'analyse des résultats, leur qualité et leur reproductibilité (Chang et al., 2013). *ApaI* est l'enzyme classiquement utilisée chez *A. baumannii* (Durmaz et al., 2009; Seifert et al., 2005), elle génère des profils complexes avec plus de 40 bandes par profils. Néanmoins, suite à une analyse *in silico* des génomes de 6 souches bactériennes séquencées, Chang et ses collègues ont identifié 9 enzymes de restriction de coupure rare avec 10 à 50 sites de restriction (*ApaI*, *AscI*, *AsiSI*, *MreI*, *PasI*, *SanDI*, *SbfI*, *SfiI*, et *SgrAI*) (Chang et al., 2013). *ApaI* était l'enzyme la plus discriminante, la moins coûteuse (0,03\$/digestion), mais générait des profils complexes. *AscI* et *AsiSI* sont raisonnables en terme de coût (0,49\$ et 0,98\$/digestion respectivement), avec un pouvoir discriminant comparable à *ApaI*, et générant des profils simples avec 10 à 20 bandes

par profil. Suite à ces résultats, les auteurs ont recommandé l'utilisation *AscI* comme principale enzyme de restriction et *AsiSI* comme enzyme de restriction secondaire. Toutefois, aucune étude épidémiologique n'a testé l'efficacité de cette enzyme dans les protocoles de champ pulsé. Nous avons évalué la pertinence d'*AscI* sur quelques souches. Des profils avec moins de bandes ont été obtenus, ce qui laisse supposer que *AscI* peut représenter un nouveau candidat pour les protocoles de PFGE. Toutefois, une optimisation de notre protocole doit être réalisée suite à des petits problèmes techniques (Figure 8).



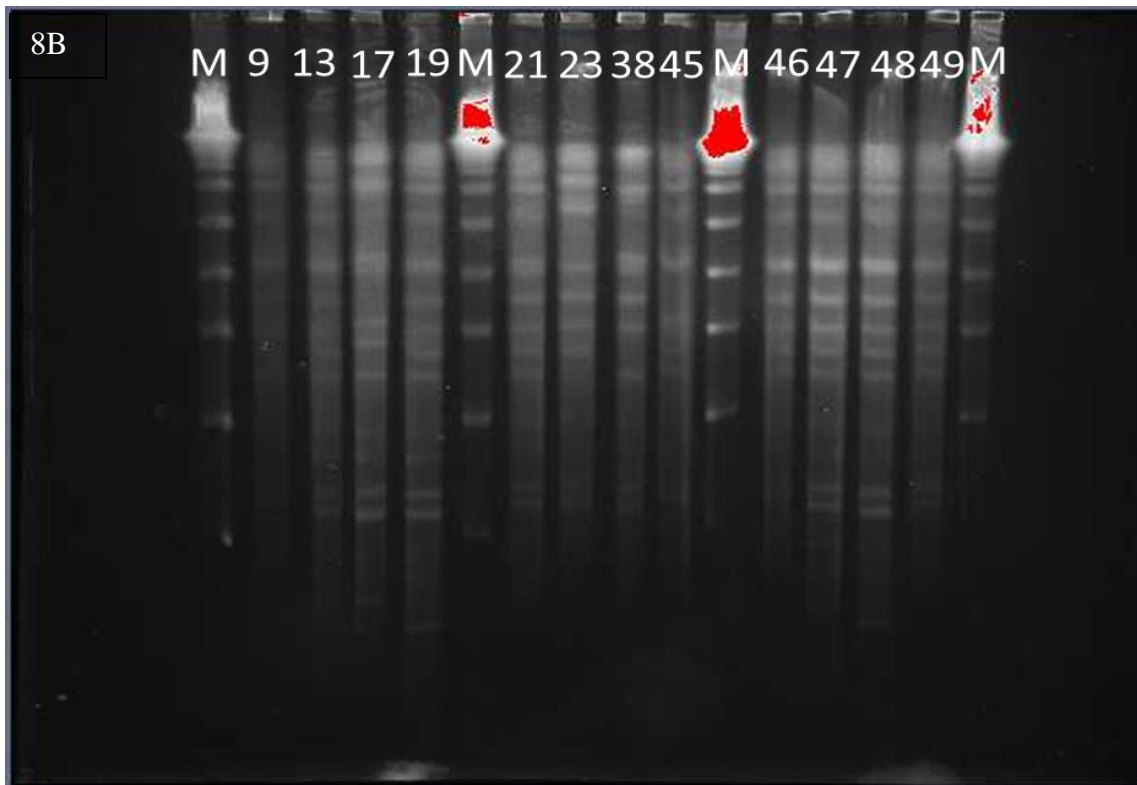


Figure 8 : Migration électrophorétique en champ pulsé de 12 souches d'*A. baumannii* après digestion enzymatique. 8A: digestion par *ApaI*. 8B: digestion par *AsclI*.

M: marqueur de poids moléculaire; les numéros de chaque souche sont écrits au-dessus de chaque puits. (Voir chapitre 2 pour plus de détail sur les données de chaque souche).

Chapitre trois-Article 3

Molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* in Tripoli, Lebanon

Article en préparation - Soumission prévue dans Journal of Infection

Rayane Rafei^{1,2}, Marie Kempf^{1,3*}, Monzer Hamze², Hassan Mallat², Matthieu Eveillard^{1,3}, Marie-Laure Joly-Guillou^{1,3}, Fouad Dabboussi²

¹ L'UNAM Université, Université d'Angers, Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, UPRES EA3142, Institut de Biologie en Santé – IRIS, CHU, 4, rue Larrey, 49933 Angers cedex, France.

² Laboratoire Microbiologie Santé et Environnement (LMSE), Centre AZM pour la recherche en Biotechnologie et ses applications, Université Libanaise, Tripoli, Lebanon.

³ Laboratoire de Bactériologie, Institut de Biologie en Santé - PBH, CHU, 4 rue Larrey, 49933 Angers cedex, France.

Introduction

L'organisation Mondiale de la Santé a identifié la multirésistance aux antibiotiques comme une véritable menace à l'égard de la santé publique. Les pathogènes multirésistants aux antibiotiques les plus impliqués sont désignés par l'acronyme "ESKAPE" représentant *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter* spp (Howard et al., 2012). *A. baumannii* représente une bactérie "championne" de la multirésistance aux antibiotiques (y compris aux carbapénèmes), parfois "pionnière" dans ce vaste domaine avec des capacités d'épidémiogénicité étonnantes (Decré, 2012).

Généralement, un nombre limité de clones est responsable d'épidémies hospitalières et les clones internationaux I, II et III sont les plus fréquemment retrouvés (Diancourt et al., 2010). Au Liban, une étude réalisée dans les hôpitaux de Beyrouth a retrouvé les 3 clones internationaux et les souches isolées avaient comme seul mécanisme de résistance aux carbapénèmes connu la présence du gène *bla*_{OXA-58} (Di Popolo et al., 2011).

Dans cette étude, nous avons analysé 116 souches d'*A. baumannii* collectées entre 2011 et 2013 dans des hôpitaux localisés à Tripoli. Nous avons réalisé des études épidémiologiques et caractérisé les mécanismes de résistance aux carbapénèmes.

Abstract

Objectives: To study the molecular epidemiology and carbapenem resistance mechanisms of *A. baumannii* in Tripoli, Northern Lebanon.

Methods: 116 non duplicate strains isolated between 2011 and 2013 in different hospitals in Tripoli, Lebanon from Lebanese patients and wounded Syrian patients during Syrian war were studied. Antibiotic susceptibility testing was determined by agar disc diffusion and Etest. Carbapenemase-encoding genes were investigated by PCR. All isolates were typed by *bla*_{OXA-51-like} sequence based typing (SBT) and 57 strains were also analysed by MLST followed by eBURST analysis.

Results: Of 116 isolates, 70 (60%) showed carbapenem resistance phenotype. The *bla*_{OXA-23} with an upstream insertion of *ISAbal* was the major carbapenem resistance mechanism and detected in 65 isolates. Five isolates (including 4 from wounded Syrian patients and 1 from Lebanese patient) were positive for *bla*_{NDM-1}. *bla*_{OXA-51-like} SBT revealed the presence of 14 variants, where *bla*_{OXA-66} was the most common and present in 73 strains, followed by *bla*_{OXA-69} in 20 strains. MLST analysis identified 17 sequence types (ST) and showed a full concordance with *bla*_{OXA-51-like} SBT. Each clonal complex (CC) had a specific *bla*_{OXA-51} sequence such as CC2 which harboured *bla*_{OXA-66}, and CC1 harbouring *bla*_{OXA-69}. NDM-1 producing strains belonged to ST85 (4 Syrian strains) and ST25 (1 Lebanese strain).

Conclusion: Our results showed a successful predominance of international clone 2 with a widespread occurrence of OXA-23 in Lebanese hospitals. These findings emphasize the urgent need of effective measures to control the spread of *A. baumannii* in this country.

Keywords: *A. baumannii*, carbapenem resistance, *bla*_{OXA-51} sequence based typing, MLST, OXA-23, NDM-1

Introduction

A. baumannii is an emerging opportunistic pathogen mainly involved in healthcare-associated infections, with increased mortality and morbidity (1). The serious concern associated with this emergence is the increasing prevalence of multidrug resistant strains, especially carbapenem resistant strains (2). Therefore, the management of these infections has become a real public health issue in many countries (3). In a recent SENTRY Antimicrobial Surveillance program, the meropenem susceptibility percentage of *A. baumannii* showed a noticeable decrease from 52.9% in 2009 to 37.7% in 2011 in intensive care units of Europe (4). The main mechanism of resistance to carbapenems is the production of oxacillinases encoded mostly by *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-58-like} and recently *bla*_{OXA-143-like} and *bla*_{OXA-235-like} (2,5–7). At lesser degree, carbapenemases from class B and A are also involved (2,5). New Delhi metallo-β-lactamase 1 (NDM-1), a recent described metallo-β-lactamase, has emerged in *Enterobacteriaceae* as well as in *Acinetobacter* (8).

Generally, a limited number of clones are responsible for worldwide outbreaks, and where international clones I, II, and III are the most common (9). Otherwise, in order to identify, and track these clones during hospital outbreaks, numerous molecular typing methods have been proposed such as pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), amplified fragment length polymorphism (AFLP), multilocus sequence typing (MLST), repetitive-sequence-based PCR (rep-PCR) with Diversilab[®] (DL) (9–12). *bla*_{OXA-51-like} sequence-based typing (SBT) is a simple typing method based on sequencing of the full length of *bla*_{OXA-51-like} gene with a similar discriminatory power to DL, and MLST (13–15).

In Lebanon, limited number of epidemiological studies are reported, usually in Beyrouth (16–18). Recently, we reported the first detection of four NDM-1 producing strains isolated in Tripoli-Northern Lebanon from Syrian patients injured during Syrian War (19). The aim of this study was to characterize *A. baumannii* molecular epidemiology in Tripoli-

Lebanon using *bla*_{OXA-51-like} and MLST typing and to determine the carbapenem resistance mechanisms.

Materials and Methods

Bacterial isolates and Identification

The clinical isolates used in this study were collected from 6 hospitals and one private laboratory in Tripoli, Lebanon between 2011-2013 and stored in Azm Center For Research in Biotechnology and its application. Isolates were grown in blood agar at 37°C and preserved at -80°C. The bacterial identification of *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex was initially performed using MADLI-TOF Vitek[®]MS (bioMérieux[®], Marcy-l'Étoile, France) and the identity at species level was confirmed by real time PCR of *bla*_{OXA-51} gene (20) and partial RNA polymerase β-subunit (*rpoB*) gene sequencing (21).

Susceptibility testing and detection of carbapenemases

Antibiotic Susceptibility testing was performed by the disc diffusion method according to the recommendations of the French Society of Microbiology (www.sfm-microbiologie.org/). A panel of 14 antibiotics was tested including ticarcillin, ticarcillin/clavulanic acid, piperacillin/tazobactam, ceftazidime, imipenem, ciprofloxacin, amikacin, gentamicin, tobramycin, trimethoprim/sulfamethoxazole, colistin, netilmicin, doxycycline and rifampicin. Results that exhibited carbapenem resistance were confirmed by determining imipenem, meropenem and doripenem minimum inhibitory concentration (MICs) by Etest[®]strips (bioMérieux[®], Marcy-l'Étoile, France). Carbapenem resistant isolates were investigated by PCR assays for the presence of carbapenemase-encoding genes *bla*_{OXA-23} (22), *bla*_{OXA-24} (22), *bla*_{OXA-58} (22), *bla*_{OXA-143} (6), *bla*_{NDM-1} (23), *bla*_{IMP} (5), *bla*_{VIM} (5), *bla*_{KPC} (24) and the insertion sequence *ISAbal* (25). The presence of *ISAbal* upstream *bla*_{OXA-23} or *bla*_{OXA-51} genes was

tested using a combination of IS*Abal* primers with reverse primers of *bla*_{OXA-23} or *bla*_{OXA-51} respectively.

Epidemiological typing

Epidemiological typing of all isolates was carried out by *bla*_{OXA-51} sequence based typing (SBT) as described previously (14). The sequences were compared to all variants present in BLAST. When a novel sequence is detected, it is submitted to GenBank and assigned by Lahey database for beta-lactamase classification (<http://www.lahey.org/studies/webt.asp>). MLST was performed in accordance to the Pasteur scheme (<http://www.pasteur.fr/mlst>). When a new allele or a new sequence type (ST) was identified, it was submitted to Pasteur Institute MLST Database. The eBURST (<http://eburst.mlst.net/>) was applied to compare identified ST(s) to available ST(s) present in MLST Database (last update 10.06.2014). A clonal complex (CC) is defined as a set formed by the founder ST and its single locus variants (SLV) (9).

Nucleotide sequence accession numbers and novel sequence types

Four new identified ST(s) have been coded by MLST Pasteur as ST459, ST460, ST461 and ST462. A new nucleotide variant of *bla*_{OXA-51} was submitted to GenBank under the submission number KJ584915 and assigned by Lahey center as *bla*_{OXA-406}.

Results:

Bacterial strain and identification

A total of 116 non duplicate strains were obtained from 7 medical institutions in Tripoli: 73 strains from Tripoli Governmental hospital, 34 from Nini hospital, 4 from Dar Al Chiffaa hospital, 2 from monla, 1 strain from each hanane, haykal hospitals and a private laboratory. These strains were recovered from respiratory specimens 25/116 (21.55 %); wound 68/116 (58.62 %); urine 10/116 (8.62 %); catheter tips 8/116 (6.9 %), blood 1/116 (0.86 %) and other locations 3/116 (2,59 %). For one strain (0,86 %), no information was available. A total of 58

strains were isolated from Syrian patients injured during Syrian War and treated in Tripoli, The other strains were isolated from Lebanese patients (55 patients) and patients with unknown nationality (3 patients). Ninety patients were male and 26 female. The age was between 1 month and 89 years with a mean of 40 years. All these strains were confirmed as *A. baumannii* by molecular techniques.

Antibiotic susceptibility and carbapenem resistance mechanisms

Figure 1 shows antibiotic susceptibility results for the 116 strains. The majority of the isolates exhibited multidrug resistant phenotype. Overall, 70 strains were carbapenem resistant and among them, 65 carried the *bla*_{OXA-23} gene and 5 strains the *bla*_{NDM-1} gene. *ISAbal* was found in 101 strains. The presence of *ISAbal/bla*_{OXA-23} association was confirmed in all OXA-23 producing strains which explained the high level of carbapenem resistance for these strains (imipenem MIC > 32, meropenem MIC > 32, doripenem MIC > 32). The *ISAbal/bla*_{OXA-51} association was detected in any strain.

Epidemiological typing

***bla*_{OXA-51} sequence based typing**

The *bla*_{OXA-51} SBT revealed the presence of 14 different nucleotide variants. Of 116 strains, *bla*_{OXA-66} was the most prevalent sequence harboured by 73 strains, followed by *bla*_{OXA-69} 20 strains, *bla*_{OXA-64} 7 strains, *bla*_{OXA-94} 5 strains, *bla*_{OXA-120} 2 strains. Others variants, *bla*_{OXA-70}, *bla*_{OXA-71}, *bla*_{OXA-104}, *bla*_{OXA-121}, *bla*_{OXA-132}, *bla*_{OXA-406}, KF048914, KJ584924, and a *bla*_{OXA-51}-like of sequenced Ab33333 strain (AKAS01000012) were present sporadically in our collection. OXA-406, a new variant described for the first time in this study, differed from OXA-106 by only a single amino acid variant at amino acid 146 (asparagine became lysine).

MLST

MLST was performed for a set of 57 randomly selected *A. baumannii* strains representing all *bla*_{OXA-51} variants. 17 ST(s) (including 4 new ST(s) and 4 new alleles) were identified (Table

1, Figure 2). Using eBURST analysis, our ST(s) are clustered into 7 CCs (CC1, CC2, CC3, CC33, CC25, CC85, CC462) and 3 singletons. Additionally, 4 ST(s) shared similarity with one existed ST in MLST Pasteur (ST46, ST108, ST150, ST158 with ST149, ST112, ST444, ST342 respectively). No name was given for these last complexes because no more of two ST(s) have been identified yet. Notably, our novel ST459 and ST460 were a single locus variant of ST33 (founder of CC33) and ST1 (founder of CC1) respectively. ST462 was a founder for a new CC462 assembling 4 SLVs (ST35, ST271, ST418, ST419).

Concordance between the two techniques

The comparison between MLST and *bla*_{OXA-51} SBT revealed a full concordance. Isolates belonging to same clonal complex carried the same *bla*_{OXA-51} variant. Thus, strains belonging to CC1 (including ST1 and the new ST460) carried *bla*_{OXA-69}, CC2 (ST2) *bla*_{OXA-66}, CC85 (including ST6 and ST85) *bla*_{OXA-94}, CC25 *bla*_{OXA-64}, CC33 (including ST284, and the new ST459) *bla*_{OXA-120}. Each of remaining lineages (CC or singletons) that were identified had also a specific *bla*_{OXA-51} (Table 1).

Discussion

This study provides for the first time a global view of molecular epidemiology of *A. baumannii* isolates from hospitals in Tripoli, Lebanon. Tripoli is a city that hosts a large number of refugees and wounded Syrians, which may be explain the high number of wound specimens in our collection. Although, *A. baumannii* is an opportunistic nosocomial pathogen, it is increasingly reported from particular infectious contexts occurring outside hospitals such as community acquired infections (26). *A. baumannii* is also a well-documented pathogen associated with wound infections in USA troops from Iraq and Afghanistan (27,28). The typology of these situations raised questions about their origins and the potential involvement of an environmental reservoir (26). The origin of infections from

Syrian patients is very ambiguous, it is surely that nosocomial infections are occurred, but also a number of infections are present at the time of admission (19). The infection may be acquired from environmental sources in the operation theatre, during treatment in Syrian clinics, or during evacuation from Syria to Lebanon. Unfortunately, we don't have data concerning the date of injury, the conditions of care and treatment in Syria clinics.

Approximately, 60% of our isolates showed carbapenem resistance phenotype. The production of OXA-23 was the major carbapenem resistance mechanism, with an upstream insertion of *ISAbal*, thus supporting international data about the worldwide emergence of this carbapenemase (29–31). Alarmingly, 5 NDM-1 producing strains have been detected from 4 Syrian patients (19), and one Lebanese patient.

bla_{OXA-51} is an intrinsic oxacillinase gene naturally occurring in *A. baumannii*, and more than 95 variants are identified to date (32). This genetic diversity has been explored and found very interesting to identify epidemic clones (13–15,33,34), and thus the full gene sequencing is proposed as a single typing method (*bla_{OXA-51}* SBT). Recently, we have demonstrated the usefulness of *bla_{OXA-51}* SBT compared to MLST (article in press). As being simple and rapid, we have initially screen the epidemiological belonging of our isolates to the previous identified clonal lineages by *bla_{OXA-51}* SBT, then we have randomly selected isolates from each of representative *bla_{OXA-51}* sequences for MLST analysis. Notably, *bla_{OXA-51}* correctly assign all isolates to their corresponding clonal complexes (table 1).

bla_{OXA-66}, a *bla_{OXA-51}*-like gene associated with international clone 2 (CC2) (14,15,34,35) (Table 1), was the major sequence in our collection distributed in different hospitals in Tripoli (63%). PFGE was performed on 16 strains, and the same clone was shown in different hospitals (data not shown). This finding consists with worldwide dissemination of clone 2, which is reported in more than 34 countries in Europe, Asia, Africa, Australia, USA, and South America (35). Notably, the majority of our carbapenem resistant isolates (80%)

belonged to this clone with OXA-23 as the sole carbapenem resistance mechanism. The high level of antimicrobial resistance may represent the main cause for its propensity and its successful predominance in hospitals throughout the world (9,35).

*bla*_{OXA-69}, a *bla*_{OXA-51-like} gene associated with international clone 1(CC1) (14,15,34,35) (Table 1), was the second most sequence found in our collection. PFGE was performed on 6 strains, and 4 clones was shown (data not shown). This indicates the heterogeneity of this clone unlike clone 2. Interestingly, we have detected two OXA-23 producing carbapenem isolates from the wound of Syrian patients, and belonging to a new sequence type ST460 (SLV of ST1).

*bla*_{OXA-94}, a *bla*_{OXA-51-like} gene associated with clonal complex CC85 (named as CC6 in reference (15)). At this time, this clonal complex is formed by 3 ST(s): ST85 (the predicted founder), ST6 and ST464. *bla*_{OXA-51} SBT revealed the same sequence *bla*_{OXA-94} in the two identified sequences ST6 and ST85 in this study. We have recently detected ST464 from the chicken and we found also *bla*_{OXA-94} as a *bla*_{OXA-51} variant (unpublished data). Our 4 NDM-1 producing Syrian strains belonged to ST85. Indeed, this ST has also been responsible for an outbreak in France, and is usually imported from North Africa (36,37) and seems to be an emerging clone.

*bla*_{OXA-64} is a *bla*_{OXA-51} variant associated with CC25 (15). ST25 (the founder of CC25) was also an emerging clone reported in Europe, Asia, Africa and USA (35,38), and from pets in Reunion Islands (39). Different carbapenemases have been identified in this clone, as OXA-23, OXA-24 and OXA-58 (35). Otherwise, NDM-1 producing ST25 has also detected in Germany and Kenya (38,40,41). Within our 4 identified isolates belonging to ST25, one isolate was NDM-1 producing recovered from a urine sample of a 80-year-old Lebanese patient suffering from amyloidosis and anaemia at Nini hospital, Tripoli, Lebanon. This is the first detection of NDM-1 producing *A. baumannii* outside Syrian patients.

The majority of susceptible strains are very diverse belonging to several sequence types (Table 1). Nevertheless, our collection does not represent the real prevalence and the diversity of Lebanese susceptible genetic pool because it is not a prospective study, and may be biased by the high number of carbapenem resistant strains.

In conclusion, *bla*_{OXA-51} SBT is a reliable and fast method able to assign our isolates to their clonal complexes. This study also highlights the emergence of NDM-1, and OXA-23 carbapenemases in Tripoli, Lebanon and the urgent need of effective measures to control the spread of *A. baumannii* in this country. Other multicentre studies are required to investigate the situation in other cities in Lebanon.

Acknowledgements

We thank the team of the curators of the Institut Pasteur MLST system (Paris, France) for importing novel alleles, profiles and/or isolates at <http://www.pasteur.fr/mlst>. We thank also Catherine Ramont, Mariam Yehya and Taha Abdo for excellent technical assistance.

References

1. Joly-Guillou ML. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. Clin Microbiol Infect. 2005;11(11):868–73.
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(2):105–14.
3. Hsueh PR, Teng LJ, Chen CY, Chen WH, Yu CJ, Ho SW, et al. Pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* causing nosocomial infections in a university hospital, Taiwan. Emerg Infect Dis. 2002;8(8):827–32.
4. Sader HS, Farrell DJ, Flamm RK, Jones RN. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms isolated from patients hospitalized in intensive care units in United States and European hospitals (2009-2011). Diagn Microbiol Infect Dis. 2014;78(4):443–8.

5. Bonnin RA, Nordmann P, Poirel L. Screening and deciphering antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii* : a state of the art. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2013;11(6):571–83.
6. Higgins PG, Lehmann M, Seifert H. Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;35(3):305.
7. Higgins PG, Pérez-Llarena FJ, Zander E, Fernández A, Bou G, Seifert H. OXA-235, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(5):2121–6.
8. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Worldwide dissemination of the NDM-Type carbapenemases in gram-negative bacteria. *BioMed Res Int*. 2014;2014.
9. 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(4):e10034.
10. Seifert H, Dolzani L, Bressan R, van der Reijden T, van Strijen B, Stefanik D, et al. Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol*. 2005;43(9):4328–35.
11. Nemec A, Dijkshoorn L, van der Reijden TJ. Long-term predominance of two pan-European clones among multi-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in the Czech Republic. *J Med Microbiol*. 2004;53(2):147–53.
12. Higgins PG, Dammhayn C, Hackel M, Seifert H. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65(2):233 –238.
13. Zander E, Nemec A, Seifert H, Higgins PG. Association between β -lactamase-encoding *bla*_{OXA-51} variants and DiversiLab rep-PCR-based typing of *Acinetobacter baumannii* isolates. *J Clin Microbiol*. 2012;50(6):1900–4.

14. Hamouda A, Evans BA, Towner KJ, Amyes SG. 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*. 2010;48(7):2476–83.
15. Pournaras S, Gogou V, Giannouli M, Dimitroulia E, Dafopoulou K, Tsakris A, et al. Single locus sequence-based typing of *bla*_{OXA-51-like} gene for rapid classification of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates to international clones. *J Clin Microbiol*. 2014;52(5):1653–7.
16. Zarrilli R, Vitale D, Di Popolo A, Bagattini M, Daoud Z, Khan AU, et al. A plasmid-borne *bla*_{OXA-58} gene confers imipenem resistance to *Acinetobacter baumannii* isolates from a Lebanese hospital. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(11):4115–20.
17. 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*. 2011;17(2):197–201.
18. Giannouli M, Tomasone F, Agodi A, Vahaboglu H, Daoud Z, Triassi M, et al. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in intensive care units of multiple Mediterranean hospitals. *J Antimicrob Chemother*. 2009;63(4):828–30.
19. Rafei R, Dabboussi F, Hamze M, Eveillard M, Lemarié C, Mallat H, et al. First report of *bla*_{NDM-1}-producing *Acinetobacter baumannii* isolated in Lebanon from civilians wounded during the Syrian war. *Int J Infect Dis*. 2014;21:21–3.
20. Kempf M, Rolain JM, Diatta G, Azza S, Samb B, Mediannikov O, et al. Carbapenem resistance and *Acinetobacter baumannii* in Senegal: the paradigm of a common phenomenon in natural reservoirs. *PloS One*. 2012;7(6):e39495.

21. Gundi VA, Dijkshoorn L, Burignat S, Raoult D, La Scola B. Validation of partial *rpoB* gene sequence analysis for the identification of clinically important and emerging *Acinetobacter* species. *Microbiology*. 2009;155(7):2333–41.
22. 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*. 2013;17(9):e739–e743.
23. Bonnin RA, Naas T, Poirel L, Nordmann P. Phenotypic, biochemical, and molecular techniques for detection of Metallo- β -Lactamase NDM in *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol*. 2012;50(4):1419–21.
24. Hong SS, Kim K, Huh JY, Jung B, Kang MS, Hong SG. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding class A carbapenemases. *Ann Lab Med*. 2012;32(5):359–61.
25. Ruiz M, Marti S, Fernandez-Cuenca F, Pascual A, Vila J. Prevalence of IS*Abal* in epidemiologically unrelated *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Clin Microbiol Infect*. 2007;13(1):1192–8.
26. Eveillard M, Kempf M, Belmonte O, Pailhoriès H, Joly-Guillou ML. Reservoirs of *Acinetobacter baumannii* outside the hospital and potential involvement in emerging human community-acquired infections. *Int J Infect Dis*. 2013;17:e802–e805.
27. O’Shea MK. *Acinetobacter* in modern warfare. *Int J Antimicrob Agents*. 2012;39(5):363–75.
28. Sheppard FR, Keiser P, Craft DW, Gage F, Robson M, Brown TS, et al. The majority of US combat casualty soft-tissue wounds are not infected or colonized upon arrival or during treatment at a continental US military medical facility. *Am J Surg*. 2010;200(4):489–95.
29. Mugnier PD, Poirel L, Naas T, Nordmann P. Worldwide dissemination of the *bla*_{OXA-23} carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(1):35–40.

30. Grosso F, Carvalho KR, Quinteira S, Ramos A, Carvalho-Assef APD, Asensi MD, et al. OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii*: a new hotspot of diversity in Rio De Janeiro? J Antimicrob Chemother. 2011;66(1):62–5.
31. Principe L, Piazza A, Giani T, Bracco S, Caltagirone MS, Arena F, et al. Epidemic diffusion of OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* in Italy: results of the first cross-sectional countrywide survey. J Clin Microbiol. 2014;52(8):3004-3010
32. Evans BA, Amyes SG. OXA β -Lactamases. Clin Microbiol Rev. 2014;27(2):241–63.
33. Aly M, Tayeb HT, Al Johani SM, Alyamani EJ, Aldughaisheem F, Alabdulkarim I, et al. Genetic diversity of OXA-51-like genes among multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in Riyadh, Saudi Arabia. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2014;33(7):1223–8.
34. Evans BA, Hamouda A, Towner KJ, Amyes SG. OXA-51-like beta-lactamases and their association with particular epidemic lineages of *Acinetobacter baumannii*. Clin Microbiol Infect. 2008;14(3):268–75.
35. 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(4):237–47.
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):20547.
37. Bonnin RA, Cuzon G, Poirel L, Nordmann P. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clone, France. Emerg Infect Dis. 2013;19(5):822–3.
38. Revathi G, Siu LK, Lu PL, Huang LY. First report of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in East Africa. Int J Infect Dis. 2013;17(12):e1255–1258.

39. Belmonte O, Pailhoriès H, Kempf M, Gaultier MP, Lemarié C, Ramont C, et al. High prevalence of closely-related *Acinetobacter baumannii* in pets according to a multicentre study in veterinary clinics, Reunion Island. *Vet Microbiol.* 2014;170(3-4):446–50.
40. Pfeifer Y, Wilharm G, Zander E, Wichelhaus TA, Göttig S, Hunfeld KP, et al. Molecular characterization of *bla*_{NDM-1} in an *Acinetobacter baumannii* strain isolated in Germany in 2007. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(9):1998–2001.
41. Bonnin RA, Poirel L, Naas T, Pirs M, Seme K, Schrenzel J, et al. Dissemination of New Delhi metallo- β -lactamase-1-producing *Acinetobacter baumannii* in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(9):E362–365.

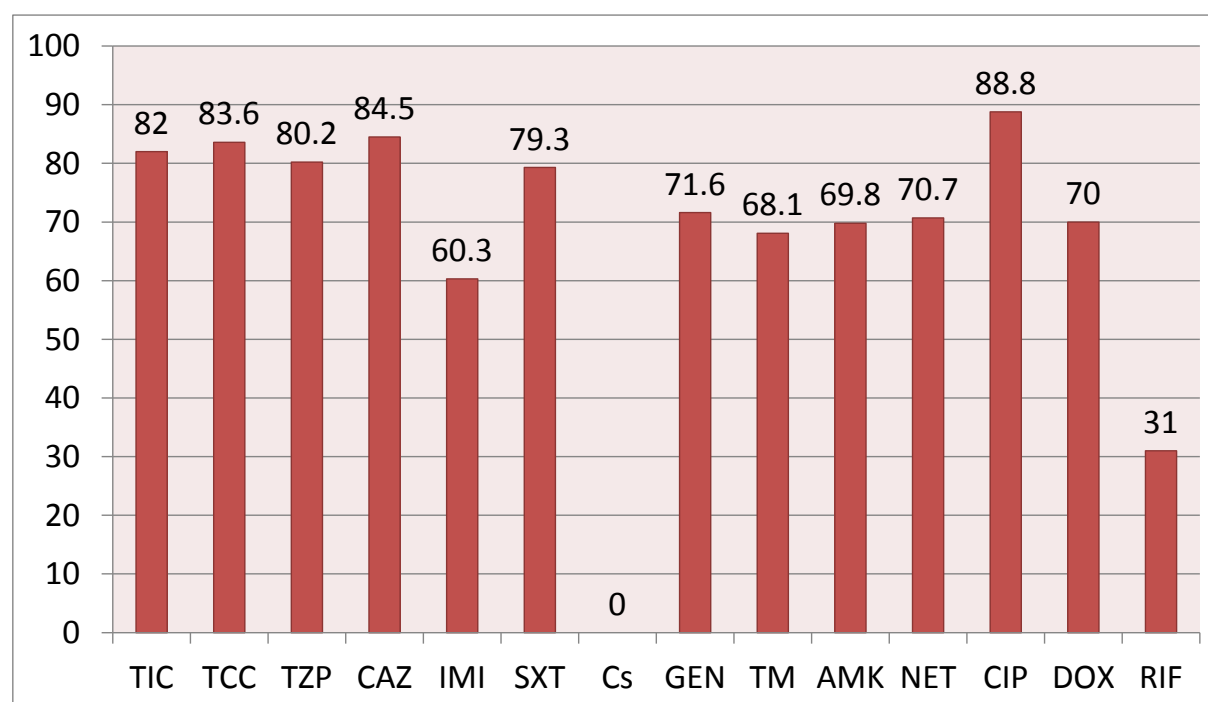


Figure 1: Percentage of antibiotic resistance of the 116 *A. baumannii* strains.

TIC (ticarcillin), TCC (ticarcillin/clavulanic acid), TZP (piperacillin/tazobactam), CAZ (ceftazidime), IMP (imipenem), SXT (trimethoprim/sulfamethoxazole), Cs (colistin), GEN (gentamicin), TM (tobramycin), AMK (amikacin), NET (netilmicin), CIP (ciprofloxacin), DOX (doxycycline) and RIF (rifampicin). Intermediate results are categorised as resistant

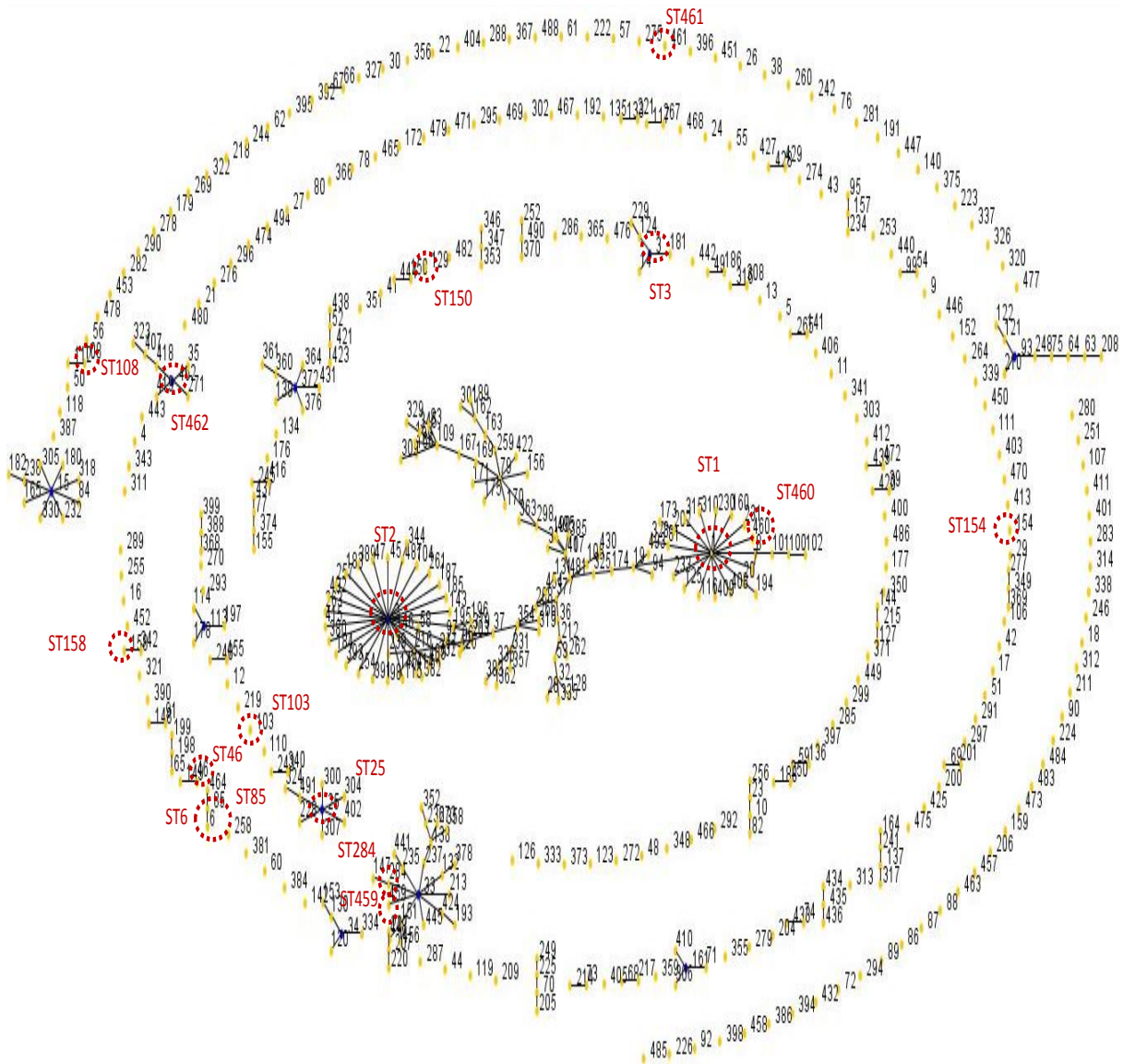


Figure 2: Population snapshot analysed by eBURST on 495 sequences present in MLST Pasteur database (last update 18.06.2014). Red circle showed identified sequence types in this study.

Table 1: Multilocus sequence typing (MLST) and *bla*_{OXA-51} SBT.

No. of isolates	<i>bla</i> _{OXA-51} variant	ST* (No. of tested strain)	CC	IMP R	Hospitals (No. of isolates)	Origin	Nationality	IMP R mechanism
73	<i>bla</i> _{OXA-66}	ST2 (21)	CC2	56R	TGH (50), Nini (14), Monla (2), private laboratory (1), Haykal (1), Dar Al Chiffaa (4), Hanane (1).	Respiratory specimen (18), catheter tip (7), wound (44), urine (1), other (2), not informed (1)	Syria (42) Lebanon (30) Unknown (1)	ISAbal/OXA-23
20	<i>bla</i> _{OXA-69}	ST1 (12) ST460 (2)	CC1	9R	TGH (17), Nini (3)	Respiratory specimen (1), Wound (19)	Syria (11) Lebanon (7) Unknown (2)	ISAbal/OXA-23
5	<i>bla</i> _{OXA-94}	ST85 (4) ST6 (1)	CC85	4R	TGH (5)	Wound (5)	Syria (4) Lebanon (1)	NDM-1
7	<i>bla</i> _{OXA-64}	ST25 (6)	CC25	1R	Nini (7)	Respiratory specimens (5), blood (1), urine (1)	Lebanon (7)	NDM-1
1	<i>bla</i> _{OXA-70}	ST103 (1)	Singleton	S	Nini	Urine	Lebanon	-
1	KF048914	ST154 (1)	Singleton	S	Nini	Urine	Lebanon	-
1	<i>bla</i> _{OXA-71}	ST3 (1)	CC3	S	Nini	Urine	Lebanon	-
1	KJ584924	ST158 (1)	C	S	Nini	Urine	Lebanon	-
1	<i>bla</i> _{OXA-104}	ST46 (1)	C	S	Nini	Urine	Lebanon	-
2	<i>bla</i> _{OXA-120}	ST459 (1)	CC33	S	Nini	Respiratory specimen (1),	Lebanon	-

		ST284 (1)				urine (1)		
1	<i>bla</i> _{OXA-121}	ST150 (1)	C	S	Nini	Ear	Lebanon	-
1	<i>bla</i> _{OXA-132}	ST108 (1)	C	S	Nini	urine	Lebanon	
1	<i>bla</i>_{OXA-406}	ST461 (1)	Singleton	S	TGH	Catheter tips	Syria	-
1	AKAS0100 0012	ST462 (1)	CC462	S	Nini	Urine	Lebanon	-

CC : clonal complex; C : complex formed by two sequence types (no number was assigned because no more of two sequences have been identified yet); IMP : imipenem, ST : sequence type, R : resistance and S : susceptible. Bold type indicates a new ST or a new *bla*_{OXA-51} allele.

*the number of strains, on which MLST is carried out, is put between parenthesis.

Commentaires

Cette étude a apporté des informations très intéressantes autour la situation épidémiologique d'*A. baumannii* à Tripoli. Nos résultats initiaux montrent que les souches résistantes aux carbapénèmes sévissent à l'état endémique dans cette ville. Parmi les 116 souches analysées, 70 (60 %) étaient résistantes aux carbapénèmes, et le gène *bla*_{OXA-23-like}, qui était précédé de la séquence d'insertion *ISAbal* était le mécanisme de résistance prépondérant (présent chez 65 de 70 souches). Les 5 autres souches (5/70) possédaient la nouvelle métallo- β -lactamase NDM-1, il s'agissait de 4 souches isolées de plaies de patients syriens blessés lors de la guerre de Syrie (confère « short communication » dans le chapitre 1) et d'une souche isolée d'une urine chez un patient libanais.

Tripoli est une ville abritant un grand nombre de réfugiés et des blessés syriens dans ses hôpitaux, ce qui explique le grand nombre des souches isolées de plaies (68/116 souches). L'implication d'*A. baumannii* dans les infections survenant chez les militaires a été bien documentée lors de la guerre d'Iraq et Afghanistan (Eveillard and Joly-Guillou, 2012; Eveillard et al., 2013; O'Shea, 2012). La typologie de l'acquisition de ces infections est très ambiguë, ouvrant ainsi un débat sur la question de l'origine nosocomiale ou environnementale en particulier l'origine tellurique. Le caractère de multirésistant rencontré dans la plupart des cas est l'argument souvent avancé par certains auteurs pour défendre l'hypothèse d'une origine hospitalière (Eveillard and Joly-Guillou, 2012). Toutefois, la présence de bactéries multirésistantes et de réservoirs potentiels de gènes de résistance a été démontré dans l'environnement (D'Costa et al., 2011; Eveillard and Joly-Guillou, 2012). Il était difficile dans notre cas de certifier le caractère nosocomial des infections. Nos souches résistantes sont très certainement présentes à l'état endémique puisque nous avons montré un même clone réparti dans différents hôpitaux, mais on ne peut pas négliger que certaines infections aient été présentes lors de l'admission du patient à l'hôpital, comme cela a été le cas pour les souches NDM-1 ce qui interroge donc sur l'origine de l'acquisition. Dans ce cas, la contamination a très certainement pu avoir lieu sur le théâtre des opérations, par projection de terre ou de roche dans la blessure du civil, lors de la prise en charge dans la clinique syrienne ou lors de l'évacuation de Syrie au Liban (Rafei et al., 2014).

Comme nous avons montré l'utilité du séquençage du gène *bla*_{OXA-51} (chapitre 2), nous avons voulu caractériser l'appartenance épidémiologique de nos isolats par cette technique. Nous avons trouvé près de 14 variants différents de ce gène chez les 116 souches. Ces

résultats étaient concordants avec ceux attendus : chaque complexe clonal a un variant spécifique comme CC1 (ST1 et le nouveau ST460) qui a le variant *bla*_{OXA-69}, CC85 (ST6 et ST85) qui a le variant *bla*_{OXA-94}, ou encore le CC33 (ST284 et le nouveau ST459) qui a le variant *bla*_{OXA-120}.

De façon intéressante, les souches résistantes aux carbapénèmes appartiennent à des complexes clonaux émergents, comme le clone international 2 (CC2), le clone international 1 (CC1), le clone international 7 (CC25) et le CC85. Cette situation était identique à celle retrouvée dans les hôpitaux d'Abu-Dhabi où les souches épidémiques appartenaient principalement aux clones internationaux 1, 2, et 7 et étaient des souches multirésistantes incluant des souches résistantes aux carbapénèmes. Les souches sporadiques présentaient une plus grande variabilité génétique et étaient généralement des souches sensibles aux antibiotiques (Sonnevend et al., 2013).

Chapitre quatre-Article 4

Extra hospital epidemiology of *Acinetobacter baumannii* in Lebanon

Article en préparation pour soumission dans Applied Environmental Microbiology

Rayane Rafei^{1,2}, Marie Kempf^{1,3*}, Fouad Dabboussi², Monzer Hamze², Hélène Pailhoriès^{1,3}, Matthieu Eveillard^{1,3}, Laurent Marsollier⁴, Marie-Laure Joly-Guillou^{1,3}

¹ L'UNAM Université, Université d'Angers, Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, UPRES EA3142, Institut de Biologie en Santé – IRIS, CHU Angers, France.

² Laboratoire Microbiologie Santé et Environnement (LMSE), Centre AZM pour la recherche en Biotechnologie et ses applications, Université Libanaise, Tripoli, Lebanon.

³ Laboratoire de Bactériologie, Institut de Biologie en Santé - PBH, CHU, 4 rue Larrey, 49933 Angers cedex, France.

⁴ LUNAM Université d'Angers, ATOMycA, Inserm Avenir Team, CRCNA, Inserm U892, 6299 CNRS Angers, France

Introduction

Alors que l'écologie d'*A. baumannii* est assez bien caractérisée en milieu hospitalier, l'écologie extra-hospitalière reste encore peu connue à ce jour et fait l'objet d'un large débat (Eveillard et al., 2013; Peleg et al., 2008; Towner, 2009). Les membres du genre *Acinetobacter* sont considérés comme des espèces ubiquitaires isolées de différents environnements. Toutefois, selon de nombreux auteurs, l'hypothèse supposant la présence ubiquitaire d'*A. baumannii* dans la nature est considérée comme une fausse conception (Peleg et al., 2008; Towner, 2009). L'une des raisons de cette discordance d'opinion provient peut-être des difficultés rencontrées lors de l'identification d'*A. baumannii* et dans sa différenciation avec ses espèces voisines du complexe *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* très rapportées dans l'environnement.

D'autre part, la description d'infections à *A. baumannii* hors du contexte hospitalier soulève la question d'un potentiel réservoir environnemental. Ainsi, des infections communautaires sévères ont été décrites, particulièrement dans les zones tropicales (Falagas et al., 2007; Leung et al., 2006), mais également chez les militaires blessés en Iraq et Afghanistan et chez les survivants des catastrophes naturelles (Oncül et al., 2002; Petersen et al., 2007; Scott et al., 2007).

Les outils d'identification moléculaire ont permis d'améliorer notre compréhension sur la présence de cette bactérie dans l'environnement. *A. baumannii* peut coloniser des personnes saines (Berlau et al., 1999b; Chu et al., 1999; Dijkshoorn et al., 2005; Seifert et al., 1997). Cette bactérie a pu être isolée de différents environnements tels que le sol (Obuekwe et al., 2009; Sarma et al., 2004), les environnements en contact avec l'homme (Choi et al., 2012) comme les végétaux (Berlau et al., 1999a; Houang et al., 2001), la viande, le poisson (Houang et al., 2001) ou encore le lait (Gurung et al., 2013). Chez les animaux, *A. baumannii* est un pathogène émergent (Endimiani et al., 2011). Il a été décrit dans la flore normale des animaux vertébrés mais également chez les invertébrés (Belmonte et al., 2014; Gouveia et al., 2008; Kempf et al., 2012b; La Scola and Raoult, 2004).

Toutefois, un nombre limité d'études utilise des techniques moléculaires de génotypage pour explorer la population bactérienne (Belmonte et al., 2014; Hamouda et al., 2011; Kempf et al., 2012a). Des études contradictoires ont rapporté tantôt la présence dans l'environnement de clones similaires à ceux retrouvés en milieu hospitalier (Belmonte et al., 2014), et tantôt la présence de clones différents de ceux isolés chez les patients (Hamouda et al., 2011).

Au Liban, il n'existe à ce jour aucune donnée sur la présence d'*A. baumannii* dans l'environnement extra-hospitalier. Le but de cette étude est de rechercher la présence de cette bactérie dans différents environnements du territoire libanais, dans les aliments et chez des animaux, d'en étudier le profil de sensibilité aux antibiotiques et enfin de caractériser les clones circulants par deux techniques de typage: *bla*_{OXA-51} SBT et la MLST.

Abstract

The presence of *Acinetobacter baumannii* outside hospitals is still a controversial issue. The objective of our study was to explore the extra hospital epidemiology of *A. baumannii* in Lebanon. From February 2012 to October 2013, a total of 73 water samples, 51 soil samples, 37 raw cow milk samples, 50 cow meat samples, 7 raw cheese samples and 379 animal samples were analyzed for the presence of *A. baumannii* by enrichment culture, followed by growth on selective media (selective MacConkey agar and/or CHROMagar). *A. baumannii* strains were identified based on partial sequencing of *rpoB* gene. These strains were investigated for their antibiotic susceptibility by using the disc diffusion method, IS*AbaI* insertion sequence, and *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-58}, and *bla*_{OXA-143} carbapenemases encoding genes. The extra hospital clones were studied by two genotyping approaches: Multi locus sequencing typing (MLST) and *bla*_{OXA-51} sequence-based typing (*bla*_{OXA-51} SBT). *A. baumannii* was detected from 6.9% water, from food in 2.7% milk, 8% meat, 14.3% cheese and from 7.7% animals. All isolates (except one strain) showed a susceptible phenotype and lacked carbapenemase encoding genes. One strain showed low level carbapenem resistance and was found to harbor *bla*_{OXA-143} gene. This is the first report of *bla*_{OXA-143} outside Brazil and south Korea from a horse origin. MLST analysis revealed the presence of 36 sequence types (ST) where 24 were novel ST(s), reported for this time in this paper. Some of these 12 previously worldwide identified ST(s) are very known for their role in human infection diseases as ST1 and ST10. The majority of novel ST(s) was very diverse and non-similar ST(s) have been described yet. Finally, *bla*_{OXA-51} SBT showed the presence of 34 *bla*_{OXA-51} variants where 21 were novel genes isolated from animal origin. Consequently, animals can be a potential reservoir for *A. baumannii* and the dissemination of new emerging carbapenemases. The role of novel identified animal clones in community-acquired infections should be investigated.

Keywords: extra hospital epidemiology, Lebanon, MLST, *bla*_{OXA-51} SBT, *bla*_{OXA-51}

Introduction

Since the last decades, *Acinetobacter baumannii* has evolved from a low-grade to a major pathogen involved in a wide number of hospital-acquired infections like ventilator-associated pneumonia and catheter-related bloodstream infections usually associated with increased mortality and morbidity (1). This rapid evolution is mainly due to a remarkable ability to acquire resistance mechanisms to almost available antimicrobial agents including carbapenems (1–3). Genotyping approaches has attributed this global spread to a limited number of successful clones responsible for the majority of worldwide nosocomial outbreaks (4–6). Among them, international clone 1 and 2 are extensively disseminated in more than 30 countries (2).

Despite the fact that the hospital ecology of this bacterium is intensively studied, its primitive ecology outside hospitals remains unclear and subject of large debate (7–9). Difficulties regarding *A. baumannii* identification methods enhances this ambiguity (9). Notably, this debate has been growing up after the worrying apparition of various aspects of emerging *Acinetobacter* infections and the raised issues about their potential origins and the implication of environmental reservoirs. *A. baumannii* can cause severe community-acquired pneumonia occurring mainly during warmest and humid months in tropical and subtropical zones (10, 11). In addition, *A. baumannii* isolates were recovered from wounds of survivors after natural disasters (12, 13), as well as of soldiers (14) and civils (15) during warfare. In the community, reports studying *A. baumannii* human carriage are very scarce and the prevalence varied according to the countries and the used identification methods from 0.5% to 3% in Europe (16–18), 4% in Hong Kong (19), 5.4% in Senegal (20) and 10.4% in USA (21). *A. baumannii* was found also in environments like soil (22, 23), water (24, 25) and life

environments (26, 27), in food like vegetables (22, 28), fish, meat (22) and raw bulk tank milk (29). In animals, *A. baumannii* was an emerging pathogen in veterinary clinics in Germany (30) and Switzerland (31). Furthermore, *A. baumannii* was found in the normal flora of some animals (20, 32, 33). Beside vertebrate animals, the presence of *A. baumannii* was reported in worldwide human body and head lice (20, 34–36), as well as in arthropods (37).

Unlike clinical strains, limited reports used genotyping methods to explore the extra hospital epidemiology of *A. baumannii* strains (20–22, 26, 27, 32, 33, 35). This epidemiology was differed heavily between these studies from a susceptible population (21, 29, 33) to resistant population (20, 26, 38) and from genotypes different to that involved in human infections (21, 32) to similar human genotypes (27, 33).

In Lebanon, only clinical context has been studied (15, 39–41) and no data concerning the occurrence of *A. baumannii* outside Lebanese hospitals. The aim of this study was to look for the presence of *A. baumannii* from different environments, from food, as well as from animals in Lebanon, to study the antibiotic susceptibility and to characterize the prevailing community genotypes by using two genotyping approaches: Multilocus Sequence Typing (MLST) and *bla*_{OXA-51} Sequence-Based Typing (SBT).

Materials and Methods

Sample collection

Sampling was performed from February 2012 through October 2013, from various environmental conditions (environments, animals and food) in different regions in Lebanon (Figure 1). The majority of samples were taken from two regions in north Lebanon (figure 1): Tripoli which is the second city in Lebanon after the capital Beyrouth, and Akkar which is a rural district.

1. Isolates from water and milk samples

Seventy three water samples, and thirty seven raw cow milk samples were collected. 5 ml of sample was added to 20 ml of Baumann medium (42), a minimum enrichment medium with acetate as a sole carbon source. The samples were mixed and incubated for 48 hours at 30°C on a rotor shaker (200 rpm). Cultures were streaked on MacConkey agar with cefradine (40 mg/l), amoxicillin (10 mg/l), fosfomycin (30 mg/l) and cycloheximide (0.4 g/l) at 37°C.

2. Isolates from Soil samples

Fifty one soil samples were collected from different regions in Lebanon (Figure 1). Samples were proceeded as described with modifications (22). Briefly, a soil suspension (10%) is prepared, then stirred for 15 minutes to full homogenize the suspension and settled for 30 minutes. 5 ml of the supernatant was added to 20 ml of Baumann medium (42). Samples were incubated up to 48 hours at 30°C with vigorous agitation. After enrichment, an inoculum (10 µl) was spread on MacConkey agar with 50 mg/l of cefradine and incubated at 41°C to select *Acinetobacter baumannii* strains and inhibit other unstudied species from this natural complex sample.

3. Isolates from meat and cheese samples

Fifty minced meat and seven raw cheese samples were purchased from butchers and shops. Cheese was cut aseptically into very small piece and homogenized using a stomacher bag (Interscience, Saint Nom, France). A suspension (10%) of meat or cheese is prepared and the same soil protocol is applied. Except after enrichment, the samples were incubated at 37°C on MacConkey agar with cefradine (40 mg/l), amoxicillin (10 mg/l), fosfomycin (30 mg/l) and cycloheximide (0.4 g/l).

4. Isolates from animal samples

Three hundred seventy nine samples were collected from cows, cats, horses, goats, dogs, sheep, rabbits, donkey, mule, goose, chickens, pigeons and pigs. These samples were

recovered from fecal specimens, or from rectum and/or mouth swabbing. For fecal specimens, feces were recovered directly after defecation or from cow anus to limit contamination with soil or any other sources. Swabs used to recover feces or to sample rectum and/or mouth were inoculated in 25 ml of Baumann medium, mixed and incubated at 37°C up to 48 hours. The cultures were spread on MacConkey agar with cefradine (40 mg/l), amoxicillin (10 mg/l), fosfomicin (30 mg/l) and cycloheximide (0.4 g/l). Approximately, 100 samples were streaked both on aforementioned MacConkey medium with 3 antibiotics and antifungal agent and on commercial medium CHROMagar™ *Acinetobacter* (CHROMagar, France) to validate our medium.

Bacterial Identification

Morphotype type colonies (uncolored colonies on MacConkey agar and red colonies on CHROMagar) were selected for further identification. *Acinetobacter* genus identification was presumptively performed on the basis of gram's stain, negative oxidase test and Vitek® MS (bioMérieux®, Marcy-l'Étoile, France). Identification was further confirmed by partial sequencing of *rpoB* gene. When an isolate identified as *Acinetobacter baumannii* by *rpoB* gene (43), a real time PCR targeting *bla*_{OXA-51-like} gene was done (20). In addition of isolated strains from samples, twelve strains identified as *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex and conserved on the collection of Azm center for research in Biotechnology and its application were also incorporated in this study. These strains were recovered from raw cheese and lettuce.

Susceptibility testing and Investigation of carbapenemase encoding genes

Antibiotic Susceptibility testing was determined by the disc diffusion method according to the recommendations of the French Society of Microbiology (www.sfm-microbiologie.org/) with a panel of 14 antimicrobial agents (Discs Biorad, France) for all *A. baumannii* strains. These agents are the following: ticarcillin, ticarcillin + clavulanic acid, piperacillin + tazobactam,

ceftazidime, imipenem, ciprofloxacin, amikacin, gentamicin, tobramycin, cotrimoxazole, colistin, netilmicin, doxycyclin and rifampicin. Resistance to carbapenem is confirmed by determining minimum inhibitory concentrations (MIC) of three carbapenems (imipenem, meropenem, doripenem) by Etest[®] strips (bioMérieux[®], Marcy-l'Étoile, France). All identified *A. baumannii* isolates were investigated by PCR assays for the presence of carbapenemase encoding genes *bla*_{OXA-23} (44), *bla*_{OXA-24} (44), *bla*_{OXA-58} (44), *bla*_{OXA-143} (45), and the insertion sequence *ISAbal* (46).

Genotyping

Genotyping by MLST and *bla*_{OXA-51} sequence-based typing (SBT) was performed on all identified *A. baumannii* strains. MLST was done according to the Pasteur scheme (<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Abaumannii.html>). When a new allele or ST was identified, it is submitted to Institut Pasteur MLST Database to obtain a numerical code. The eBURST (47) was used to compare our identified ST(s) to existed ST(s) in MLST Pasteur database (last update 18.04.2014) and to assign isolates to their clonal complexes. A clonal complex (CC) is defined as a founder ST and its single locus variants (SLV) (5). The full length (825 bp) of *bla*_{OXA-51} gene was amplified and sequenced by external primers OXA-69A/OXA-69B as described (48). Sequences were compared to all variants present in BLAST. When a novel variant is detected, it is submitted to GenBank and given an oxacillinase number by the Lahey database for beta-lactamase classification (<http://www.lahey.org/studies/webt.asp>).

Nucleotide sequence accession numbers and novel sequence types

Twenty one nucleotide sequence of *bla*_{OXA-51} genes were submitted to GenBank and given the following accession numbers: KF048909 to KF048919 and KJ584916 to KJ584925 (Table 1). 24 new ST(s) has been assigned by MLST Pasteur as ST286 to ST296 and ST464 to ST476. These ST(s) had 18 novel alleles.

Results:

Bacterial species identification

Table 2 showed the results of identification of all studied *Acinetobacter* species according to the origin of sample. Overall 597 samples (51 from soil, 73 from water, 7 from raw cheese, 37 from raw cow milk, 50 from cow meats, 379 from animals) were collected and 149 *Acinetobacter* strains were isolated. Twelve *Acinetobacter* strains previously recovered from lettuce and cheese before this study were also incorporated, thus a total of 161 *Acinetobacter* strains were studied and 42 *A. baumannii* were identified. Soil was sampled in urban and agricultural zones. Any *A. baumannii* has been identified and 9 other *Acinetobacter* spp were cultured (Table 2). Water samples were obtained from 51 human artesian well, 13 water used by animals, 2 ponds, 4 water sources and 3 rivers. *A. baumannii* was isolated in human water artesian wells, animal water and water sources (Table 1). For cheese, 2 *A. baumannii* have been identified in 1 sample and 1 conserved strain. The 6 lettuce isolated strains were identified as *A. pittii* (4), *A. calcoaceticus* (1), *A. soli* (1). For milk, one *A. baumannii* strain was detected. Four *A. baumannii* strains were isolated from meat. A group of 221 cows (208 fecal specimens, 4 mouth swabs and 9 rectum swabs), 55 cats (47 rectum swabs, 7 rectum and mouth swabs and 1 mouth swab), 6 horses (mouth swabs), 9 goats (2 fecal specimens and 7 mouth swabs), 27 dogs (21 rectum swabs, 5 mouth swabs and 1 rectum and mouth swab), 11 sheep (3 mouth and 8 fecal specimens), 3 rabbits (mouth swabs), 1 donkey (fecal specimen), 1 mule (fecal specimen), 1 goose (fecal specimen), 10 chickens (2 mouth swabs, 3 rectum swabs and 5 fecal specimens), 7 pigeons (2 mouth swabs, 2 rectum swabs and 3 fecal specimens) and 27 pigs (fecal specimens) was searched for the presence of *A. baumannii*. *A. baumannii* was detected in 16 cows, one cow harbored two different *A. baumannii* strains, 2 cats, 1 horse, 3 goats, 3 dogs, 1 rabbit, 1 donkey, 1 mule, 1 chicken (Table 1 and 2).

Moreover, thirty strains had new partial *rpoB* sequences and were considered as novel putative species.

To test the effectiveness of our MacConkey agar medium on the detection of *A. baumannii* strains (see materials and methods section). We firstly cultured *A. baumannii* (ATCC[®] 19606[™]) at 37°C using a panel of antibiotic concentration combinations and a full growth was obtained with these concentrations: cefradine (40 mg/l), amoxicillin (10 mg/l) and fosfomycin (30 mg/l) and cycloheximide antifungal agent (0.4 g/l). Secondly, we compared our medium with the commercial chromogenic *Acinetobacter* medium CHROMagar[™] *Acinetobacter* (CHROMagar, France). A concordance between the two mediums on *A. baumannii* detection but the commercial medium was more efficient on the detection of other *Acinetobacter* spp as *A. schindleri*, Gen.sp.15 TU, *A. lwoffii*, *A. junii*, *A. johnsonii*, some *A. bereziniae* and *A. calcoaceticus* strains and some novel species (data not shown), because our medium is optimized only for the detection of *A. baumannii*, non-other *Acinetobacter* species.

Antimicrobial susceptibility testing results of *Acinetobacter baumannii*

Forty one identified *A. baumannii* strains showed a susceptible phenotype to all antibiotics except two strains intermediate to rifampicin and one resistant to ciprofloxacin and doxycyclin. Any carbapenem resistance genes have been identified in these fully susceptible strains. A strain isolated from horse mouth showing limited diameter around imipenem disk was further investigated for carbapenem MIC(s). It was imipenem sensitive (MIC=2 mg/l), meropenem intermediate (MIC=4 mg/l) and doripenem resistant (MIC=4 mg/l). A *bla*_{OXA-143} gene has been detected in this strain and confirmed by sequencing of approximately 500 bp of this gene. The insertion sequence *ISAbal* was not present in 40 strains and only two strains isolated from cats carried it in their genomes.

For other *Acinetobacter* spp isolates, approximately all strains were wild type and some few strains exhibited resistance to cotrimoxazole, ciprofloxacin, doxycyclin and rifampicin agents

(data not shown). Any strain presented carbapenem resistance phenotype except for one strain isolated from a rabbit mouth and identified as *A. pittii* showed high MIC level for imipenem (16 mg/l), meropenem (> 32 mg/l) and doripenem (> 32 mg/l) and was a OXA-24 producing strain.

MLST analysis

MLST was performed on all 42 identified *A. baumannii*. These strains were grouped into 36 different ST(s). Among them, 24 ST(s) (ST286 to ST296 and ST464 to ST476) were novel and reported for the first time in this study. 9 ST(s) (ST286 to ST288, ST293, ST464, ST469 to ST472) had new allelic profiles with new combination of previous known alleles. 15 ST(s) (ST289 to ST292, ST294 to ST296, ST465 to ST468, ST473 to ST476) had new alleles (table 1) in their allelic profiles allowing the identification of 18 novel alleles (1 *cpn60* allele, 3 *fusA* alleles, 3 *gltA* alleles, 5 *recA* alleles, 4 *rplB* alleles, 2 *rpoB* alleles). Thirty isolates had its own ST(s) and 6 pair strains had a common ST (table 1). The relationship between our ST(s) and the existed ST(s) were studied by eBURST (figure 2). Some detected ST(s) belonged to successful clonal complexes. ST1 was the founder of CC1 (known as European clone 1 (5)) formed by 17 SLV(s). ST216 was the founder of CC216 formed by 7 SLV(s). ST10 was the founder of CC known as CC10 (5) formed by 2SLV(s). ST138 had 5 SLV(s) and was a Double Locus Variant (DLV) of ST33, the founder of CC33. ST164 was part of a CC under development, and had 1 SLV. ST193 was a DLV of CC33 and had 1 SLV. ST464 was a SLV of ST85, the founder of CC85. Other ST(s) shared similarity with one ST and were the following: ST46 with ST149, ST108 with ST112, ST221 with ST133, ST250 with ST188, ST472 with ST439. The rest ST(s) (ST13, ST286 to ST296, ST465 to ST471, ST473 to ST476) were singletons and no similar ST has been yet characterized.

***bla*_{OXA-51} sequence-based typing (SBT) analysis**

The full length sequence analysis of *bla*_{OXA-51} gene of 42 *A. baumannii* revealed the presence of 34 different nucleotide sequences (Figure 3) coding to 31 different protein variants (Table 1). 26 different nucleotide sequences corresponded to a single strain whereas each of 8 sequences were harbored by a pair of strains. Between them, 21 new nucleotide sequences have been identified and attributed the following GenBank accession number (KF048909 to KF048919 and KJ584916 to KJ584925). All these accession numbers are complete *bla*_{OXA-51} gene sequences except the number KJ584919 (*bla*_{OXA-410}) which is a partial sequence. Based on multalin tool, we have detected an adenine insertion at position 820bp. This insertion didn't lead to stop codon generation within the coding sequence but instead, it contributed to a frame shift at the very end of the gene leading to the modification of the last amino acid (from a leucine to a tyrosine) and the addition of 4 amino acids. Whether this mutation affects the protein function, we don't have an evidence. This frame shift is trimmed during the GenBank submission process.

These 21 new *bla*_{OXA-51} sequence genes code to 16 novel enzymes assigned by Lahey center as OXA-338 to OXA-346 and OXA-407 to 413 and 4 known enzymes OXA-65, OXA-69, OXA-71, OXA-106 (Table 1). The figure 4 reported the full amino acid sequences of these novel enzymes compared to OXA-51, OXA-66, OXA-69, OXA-71. The *bla*_{OXA-409} gene (KJ584918) had a three nucleotides insertion (GCT) at position 56bp leading to insertion of additional cysteine at position 19 (Figure 4) without changes in the protein frame lecture but the formation of a protein with additional amino acids (275 instead of 274 amino acids). The KF048914 sequence differed from *bla*_{OXA-69} by 5 synonymous mutations: Guanine became adenine at 426bp and 540bp, cytosine became adenine at 474bp, cytosine became thymine at 511bp, thymine became cytosine at 801bp. The KF048910 sequence differed from *bla*_{OXA-106} by a single synonymous mutation (guanine became adenine at 720bp). The KJ584923

sequence differed from *bla*_{OXA-71} by a single synonymous mutation (cytosine became adenine at 15bp). The KJ584924 sequence varied from *bla*_{OXA-65} by 3 synonymous mutations (thymine became cytosine at 90bp, cytosine became thymine at 636bp, and adenine became guanine at 663bp). The novel enzyme OXA-338 is coded by two different nucleotide sequences with these GenBank accession numbers: KF048909 and KJ584925. The KJ584925 sequence differed from KF048909 sequence by 6 synonymous mutations: thymine became cytosine at 6bp, cytosine became thymine at 366bp, 610bp and 801bp, adenine became guanine at 447bp and 540bp.

Comparison between MLST and *bla*_{OXA-51} SBT

Compared with *bla*_{OXA-51} SBT; each ST had its own *bla*_{OXA-51} gene sequence with these exceptions ST216 and ST470 had the same *bla*_{OXA-51} gene, and ST295 and ST468 had the same *bla*_{OXA-344} gene. The strains belonging to the same ST harbored the same *bla*_{OXA-51} gene sequence. Despite that the same protein variant has been detected in two different ST(s) as OXA-69 in ST1 and ST292, OXA-71 in ST469 and ST475, OXA-338 in ST118 and ST286 but the *bla*_{OXA-51} nucleotide sequences coding these protein variants differed between these ST(s) as we have mentioned above.

Discussion

Although, the ubiquitous existence of *A. baumannii* in nature is considered by some authors as a common misconception (7), recent studies highlight the presence of extra hospital reservoirs and their potential involvement in community-acquired infections (9). This confusion is mainly due that almost studies used unreliable methods for *Acinetobacter* identification to access its real prevalence outside hospitals either by phenotypic methods which are unable to separate *A. baumannii* from its very closely related species belonging to

A. calcoaceticus-baumannii complex or either by 16S rRNA gene sequencing which is also not very useful for this complex (26, 49).

Our current study evidences for the first time the extra hospital presence of *A. baumannii* in Lebanon. *A. baumannii* strains have been isolated from water (5/73; 6.9%), from food in cow meat (4/50; 8%), in raw cheese (1/7, 14.3%), in raw milk (1/37; 2.7%) and in animals (29/379; 7.7%). In addition, we have investigated the presence of *A. baumannii* in 51 soil samples and we never succeeded to isolate it from this nature. In Hong Kong, *A. baumannii* was detected from all environmental sources including soil (22), but not in south Korea (26). An *A. baumannii* clinical strain unable to degrade diesel fuel within a collection of *Acinetobacter* spp strains carried *alkM* gene responsible for n-alkane degradation in its genome, and was proposed that this function was lost during evolution pathway from soil to human body (50).

MLST is considered as a gold standard technique for large epidemiological and population structure studies. Although, there are two available MLST schemes for *A. baumannii*: Bartual's MLST (51) and Pasteur's MLST (5). This two schemes are intensively applied to characterize dominated genotypes in worldwide hospitals. Currently, MLST-based global population structure is formed by 26 clones (geographically distributed in more one country) divided in 18 international clones and 8 European or Asian restricted clones (2). Indeed, to our knowledge, there is no sufficient data regarding genotypes present outside hospitals. Such approaches have a relative importance in genotypes characterization and evaluation on their repartition in clinical data that may consequently improve our understanding about the potential reservoirs, the origins and acquisition mechanisms of community-acquired infections.

There are two observations regarding our MLST-based population structure of identified extra hospitals *A. baumannii* strains. Our 36 identified ST(s) grouped both similar

human genotypes involved in human infections and 24 novel genotypes have ever been reported somewhere. In water, we identify ST1 (founder of international clone 1) (5) in an artesian well, ST108 in water sources, ST46 (5, 52) in animal water and a new ST (ST294) which is also isolated from a horse mouth in an artesian well. Although, the origin of *A. baumannii* in well waters dedicated for human use is a great concern, but we can't exclude a water contamination, as coliforms were very documented in Lebanese water (53, 54). We have also detected other human clinical ST(s) as ST216 in cheese, ST193 in raw milk (55), ST138 in cat, ST250 in goat, ST221 in rabbit, ST164 in dog (56), ST118 (57), ST10 (2, 3, 5) and ST46 (5, 52) in cows. Some of them were reported in invasive infections as ST193 (55), and ST164 (56) or as Multi drug resistant strains like ST10, ST46, ST118 (5, 52, 57). ST13, cultured from a cow meat, has been isolated from a throat dog (5). We don't have an idea about implication of these ST(s) in community-acquired infections. Indeed, ST118 was described for the first time from wound of a patient injured in the Haiti earthquake in 2010, and was a CTX-M-15 producer (57).

A. baumannii has been documented as an animal colonizer with different prevalence according to the countries: in Senegal (5.1%) (20), in Scotland (1.2%) (32), in Reunion island (6.5%) (33). Our results showed that 7.7% of animals carried *A. baumannii* in their normal flora. The majority of these strains belonged to novel ST(s), where all 24 novel identified ST(s) in this study were found in animals or in animals-derived food (cheese and cow meat). MLST analysis revealed a great diversity for these new ST(s) which are approximately singletons and no yet similar ST has been described. Except, the ST464 which is a SLV of ST85, an emerging ST in human infections and found to harbor *bla_{ndm-1}* gene from the wound of civils injured in Syrian war (15) and ST472 which shared similarity with ST439, a ST recovered from sputum in Japan (Pasteur MLST isolate database). This diversity conflicts with Hamouda findings (32) which found only 3 genotypes between 16 animals isolates

recovered from cattle and pigs and Belmonte results (33) which revealed the presence of single PFGE genotype/ST25 in pets recovered from distant geographically veterinary clinics. Whatever, we have detected same ST in different animals as ST469 in cow and goat mouth, ST286 in cow meat as well in mouth and ST292 in cows (Table 1).

*bla*_{OXA-51} is an intrinsic *A. baumannii* carbapenemase gene and regarded as tool for *A. baumannii* identification (58). Our 42 *A. baumannii* strains were positive for this gene as also Hamouda shown (32) and thus this gene can be used faithfully for *A. baumannii* identification from environmental and animals samples. *bla*_{OXA-51} sequence analysis allowed the recognition of 34 variants which 21 were novel. These 21 sequences are associated with animal origin and it seems to be a large undiscovered set of animal intrinsic *bla*_{OXA-51} variants as the three new *bla*_{OXA-148}, *bla*_{OXA-149} and *bla*_{OXA-150} variants reported in cattle in Scotland (32). In addition, our results enlighten the usefulness of *bla*_{OXA-51} as a single locus based typing (59). There is a very congruence between MLST and *bla*_{OXA-51} SBT. 34 variants are present in 36 ST(s) which correlated well with ST(s) except these two exceptions: ST216 and ST470 had the same *bla*_{OXA-51} gene, and ST295 and ST468 had the same *bla*_{OXA-344} gene. In addition, our *bla*_{OXA-51} sequences are very concordant with worldwide MLST results reported in other publications as *bla*_{OXA-69} is usually associated with ST1 (59), *bla*_{OXA-120} with ST193 (55), *bla*_{OXA-68} with ST10 (3, 60). *bla*_{OXA-94} is associated with ST85 (15), and also we found it in ST464, the SLV of ST85. Indeed, some *bla*_{OXA-51} variants detected in new ST(s) are also described in human ST as *bla*_{OXA-71} detected in our new ST, ST469 and described in international clone 3 (59). *bla*_{OXA-64} is reported in ST25 (59), but we found it in ST138, which is both DLV of ST33 and tri locus variant of ST25. Thus, there may be other unknown ST(s) binding ST25 and ST138.

Susceptibility results analysis showed that a susceptible population prevailed outside hospitals. The majority of strains (40/42) lacked the IS*Abal*, an insertion sequence considered as the first step in resistance evolution of *A. baumannii* (61). Although, the identification of

*bla*_{OXA-143} from a horse isolated *A. baumannii* and *bla*_{OXA-24} from a rabbit isolated *A. pittii* highlights the potential presence of resistance reservoirs in environment. *bla*_{OXA-143} is a very recent carbapenemase gene detected in 2009 and has been reported only in Brazil and South Korea (58). This is the first identification of this gene outside these two areas in a new ST, ST294 recovered from a horse. Until now, the *A. baumannii* population detected outside hospitals have sensitive phenotypes (21, 29, 32–34). But, there are growing concerns after the description of colistin resistant *A. baumannii* strains from life environment in south Korea (26), *bla*_{OXA-23} gene from human stool and lice in Senegal (20), NDM-1 producing *A. baumannii* from a pig in China (38), and others carbapenemase producing *Acinetobacter* spp from pets, food-producing aliments, and their environments (62).

One other important findings in our publication is the identification of 30 strains with low level of nucleotide homology with all available *Acinetobacter* described species and are assumed to be putative novel species. Several publications described new strains (22, 26, 63) which indicates that the *Acinetobacter* genus is under development and is not yet fully characterized.

In conclusion, our paper is the first to report the occurrence of *A. baumannii* strains outside Lebanese hospitals and one of the limited worldwide studies exploring the existed clones in environment, in food and in animals. The detection of successful human genotypes as international clone 1 and 10 in water and animals is a worrying issue for public health. Furthermore, the role of novel identified animal clones and their involvement in human diseases especially in community acquired infections should be investigated. Our findings suggest that animals could be a potential reservoir for *A. baumannii* and the spread of new emerging carbapenemases as *bla*_{OXA-143} into humans especially after the documented presence of *Acinetobacter* spp in ectoparasites (63), and their supposed role in spreading of these bacteria between animals and human hosts. Additional large epidemiological studies are

required to confirm the significance of our primary results and to determine the real distribution of these clones in Lebanon and the possible interactions between the different environments.

Acknowledgements

We thank the team of the curators of the Institut Pasteur MLST system (Paris, France) for importing novel alleles, profiles and isolates at <http://www.pasteur.fr/mlst>. We thank also Taha Abdo, Mariam Yehya, Farah Obeid Charrouf, Imane Darwich, Hussam Khaled for their excellent technically assisting. We are very grateful to the colleagues Dima Safadi and Marwan Osman and the veterinary doctors Rabah Outour, Rami El Rifi and Kamal Mesto for their nicely assisting in sampling.

References

1. **Kempf M, Rolain JM.** 2012. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. *Int. J. Antimicrob. Agents* **39**:105–114.
2. **Karah N, Sundsfjord A, Towner K, Samuelsen Ø.** 2012. Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii*. *Drug Resist. Updat.* **15**:237–247.
3. **Zarrilli R, Pournaras S, Giannouli M, Tsakris A.** 2013. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. *Int. J. Antimicrob. Agents* **41**:11–19.
4. **Dijkshoorn L, Aucken H, Gerner-Smidt P, Janssen P, Kaufmann ME, Garaizar J, Ursing J, Pitt TL.** 1996. Comparison of outbreak and nonoutbreak *Acinetobacter*

- baumannii* strains by genotypic and phenotypic methods. J. Clin. Microbiol. **34**:1519–25.
5. **Diancourt L, Passet V, Nemec A, Dijkshoorn L, Brisse S.** 2010. The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. PLoS ONE **5**:e10034. doi:10.1371/journal.pone.0010034.
 6. **Higgins PG, Dammhayn C, Hackel M, Seifert H.** 2010. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. J. Antimicrob. Chemother. **65**:233 – 238.
 7. **Towner KJ.** 2009. *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. J. Hosp. Infect. **73**:355–363.
 8. **Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H.** 2007. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Nat. Rev. Microbiol. **5**:939–951.
 9. **Eveillard M, Kempf M, Belmonte O, Pailhoriès H, Joly-Guillou ML.** 2013. Reservoirs of *Acinetobacter baumannii* outside the hospital and potential involvement in emerging human community-acquired infections. Int. J. Infect. Dis. **17**:e802–e805. doi:10.1016/j.ijid.2013.03.021.
 10. **Falagas ME, Karveli EA, Kelesidis I, Kelesidis T.** 2007. Community-acquired *Acinetobacter* infections. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **26**:857–868.
 11. **Ong CW, Lye DC, Khoo KL, Chua GS, Yeoh SF, Leo YS, Tambyah PA, Chua AC.** 2009. Severe community-acquired *Acinetobacter baumannii* pneumonia: an emerging highly lethal infectious disease in the Asia-Pacific. Respirol. Carlton Vic **14**:1200–1205.
 12. **Wang Y, Hao P, Lu B, Yu H, Huang W, Hou H, Dai K.** 2010. Causes of infection after earthquake, China, 2008. Emerg. Infect. Dis. **16**:974–975.

13. **Uçkay I, Sax H, Harbarth S, Bernard L, Pittet D.** 2008. Multi-resistant infections in repatriated patients after natural disasters: lessons learned from the 2004 tsunami for hospital infection control. *J. Hosp. Infect.* **68**:1–8.
14. **Sheppard FR, Keiser P, Craft DW, Gage F, Robson M, Brown TS, Petersen K, Sincock S, Kasper M, Hawksworth J, Tadaki D, Davis TA, Stojadinovic A, Elster E.** 2010. The majority of US combat casualty soft-tissue wounds are not infected or colonized upon arrival or during treatment at a continental US military medical facility. *Am. J. Surg.* **200**:489–495.
15. **Rafei R, Dabboussi F, Hamze M, Eveillard M, Lemarié C, Mallat H, Rolain JM, Joly-Guillou ML, Kempf M.** 2014. First report of *bla*_{NDM-1}-producing *Acinetobacter baumannii* isolated in Lebanon from civilians wounded during the Syrian war. *Int. J. Infect. Dis.* **21**:21–23.
16. **Seifert H, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Pelzer N, Tjernberg I, Vaneechoutte M.** 1997. Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *J. Clin. Microbiol.* **35**:2819–2825.
17. **Berlau J, Aucken H, Malnick H, Pitt T.** 1999. Distribution of *Acinetobacter* species on skin of healthy humans. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **18**:179–183.
18. **Dijkshoorn L, van Aken E, Shunburne L, van der Reijden TJ, Bernardts AT, Nemec A, Towner KJ.** 2005. Prevalence of *Acinetobacter baumannii* and other *Acinetobacter* spp. in faecal samples from non-hospitalised individuals. *Clin. Microbiol. Infect.* **11**:329–332.
19. **Chu YW, Leung CM, Houang ET, Ng KC, Leung CB, Leung HY, Cheng AF.** 1999. Skin carriage of acinetobacters in Hong Kong. *J. Clin. Microbiol.* **37**:2962–2967.

20. **Kempf M, Rolain JM, Diatta G, Azza S, Samb B, Mediannikov O, Gassama Sow A, Diene SM, Fenollar F, Raoult D.** 2012. 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.
21. **Zeana C, Larson E, Sahni J, Bayuga SJ, Wu F, Della-Latta P.** 2003. The epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: does the community represent a reservoir? *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **24**:275–279.
22. **Houang ET, Chu YW, Leung CM, Chu KY, Berlau J, Ng KC, Cheng AF.** 2001. Epidemiology and infection control implications of *Acinetobacter* spp. in Hong Kong. *J. Clin. Microbiol.* **39**:228–234.
23. **Vangnai AS, Petchkroh W.** 2007. Biodegradation of 4-chloroaniline by bacteria enriched from soil. *FEMS Microbiol. Lett.* **268**:209–216.
24. **Guardabassi L, Dalsgaard A, Olsen JE.** 1999. Phenotypic characterization and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. isolated from aquatic sources. *J. Appl. Microbiol.* **87**:659–667.
25. **Huys G, Bartie K, Cnockaert M, Hoang Oanh DT, Phuong NT, Somsiri T, Chinabut S, Yusoff FM, Shariff M, Giacomini M, Teale A, Swings J.** 2007. Biodiversity of chloramphenicol-resistant mesophilic heterotrophs from Southeast Asian aquaculture environments. *Res. Microbiol.* **158**:228–235.
26. **Choi JY, Kim Y, Ko EA, Park YK, Jheong WH, Ko G, Ko KS.** 2012. *Acinetobacter* species isolates from a range of environments: species survey and observations of antimicrobial resistance. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **74**:177–180.
27. **Rose M, Landman D, Quale J.** 2014. Are community environmental surfaces near hospitals reservoirs for gram-negative nosocomial pathogens? *Am. J. Infect. Control* **42**:346–348.

28. **Berlau J, Aucken HM, Houang E, Pitt TL.** 1999. Isolation of *Acinetobacter* spp including *A. baumannii* from vegetables: implications for hospital-acquired infections. *J. Hosp. Infect.* **42**:201–204.
29. **Gurung M, Nam HM, Tamang MD, Chae MH, Jang GC, Jung SC, Lim SK.** 2013. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* from raw bulk tank milk in Korea. *J. Dairy Sci.* **96**:1997–2002.
30. **Zordan S, Prenger-Berninghoff E, Weiss R, van der Reijden T, van den Broek P, Baljer G, Dijkshoorn L.** 2011. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in veterinary clinics, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* **17**:1751–1754.
31. **Endimiani A, Hujer KM, Hujer AM, Bertschy I, Rossano A, Koch C, Gerber V, Francey T, Bonomo RA, Perreten V.** 2011. *Acinetobacter baumannii* isolates from pets and horses in Switzerland: molecular characterization and clinical data. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**:2248–2254.
32. **Hamouda A, Findlay J, Al Hassan L, Amyes SG.** 2011. Epidemiology of *Acinetobacter baumannii* of animal origin. *Int. J. Antimicrob. Agents* **38**:314–318.
33. **Belmonte O, Pailhoriès H, Kempf M, Gaultier MP, Lemarié C, Ramont C, Joly-Guillou ML, 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.
34. **La Scola B, Raoult D.** 2004. *Acinetobacter baumannii* in human body louse. *Emerg. Infect. Dis.* **10**:1671–1673.
35. **Kempf M, Abdissa A, Diatta G, Trape JF, Angelakis E, Mediannikov O, La Scola B, Raoult D.** 2012. Detection of *Acinetobacter baumannii* in human head and body lice from Ethiopia and identification of new genotypes. *Int. J. Infect. Dis.* **16**:e680–683. doi:10.1016/j.ijid.2012.05.1024.

36. **Bouvresse S, Socolovshi C, Berdjane Z, Durand R, Izri A, Raoult D, Chosidow O, 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.
37. **Gouveia C, Asensi MD, Zahner V, Rangel EF, Oliveira SM.** 2008. Study on the bacterial midgut microbiota associated to different Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae). *Neotrop. Entomol.* **37**:597–601.
38. **Zhang WJ, Lu Z, Schwarz S, Zhang RM, Wang XM, Si W, Yu S, Chen L, Liu S.** 2013. Complete sequence of the *bla*_{NDM-1}-carrying plasmid pNDM-AB from *Acinetobacter baumannii* of food animal origin. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**:1681–1682.
39. **Zarrilli R, Vitale D, Di Popolo A, Bagattini M, Daoud Z, Khan AU, Afif C, Triassi M.** 2008. A plasmid-borne *bla*_{OXA-58} gene confers imipenem resistance to *Acinetobacter baumannii* isolates from a Lebanese hospital. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:4115–4120.
40. **Di Popolo A, Giannouli M, Triassi M, Brisse S, 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.* **17**:197–201.
41. **Giannouli M, Tomasone F, Agodi A, Vahaboglu H, Daoud Z, Triassi M, Tsakris A, Zarrilli R.** 2009. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in intensive care units of multiple Mediterranean hospitals. *J. Antimicrob. Chemother.* **63**:828–830.
42. **Baumann P.** 1968. Isolation of *Acinetobacter* from soil and water. *J. Bacteriol.* **96**:39–42.

43. **Gundi VA, Dijkshoorn L, Burignat S, Raoult D, 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.
44. **Mesli E, Berrazeg M, Drissi M, Bekkhoucha SN, Rolain JM.** 2013. Prevalence of carbapenemase-encoding genes including New Delhi metallo- β -lactamase in *Acinetobacter* species, Algeria. *Int. J. Infect. Dis.* **17**:e739–e743. doi:10.1016/j.ijid.2013.02.024.
45. **Higgins PG, Lehmann M, Seifert H.** 2010. Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int. J. Antimicrob. Agents* **35**:305.
46. **Ruiz M, Marti S, Fernandez-Cuenca F, Pascual A, Vila J.** 2007. Prevalence of IS*AbaI* in epidemiologically unrelated *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Clin. Microbiol. Infect.* **13**:1192–1198.
47. **Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, Spratt BG.** 2004. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J. Bacteriol.* **186**:1518–1530.
48. **Hamouda A, Evans BA, Towner KJ, Amyes SG.** 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.
49. **La Scola B, Gundi VA, Khamis A, Raoult D.** 2006. Sequencing of the *rpoB* gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter* species. *J. Clin. Microbiol.* **44**:827-832.
50. **Mara K, Decorosi F, Viti C, Giovannetti L, Papaleo MC, Maida I, Perrin E, Fondi M, Vaneechoutte M, Nemec A, van den Barselaar M, Dijkshoorn L, Fani**

- R. 2012. Molecular and phenotypic characterization of *Acinetobacter* strains able to degrade diesel fuel. Res. Microbiol. **163**:161–172.
51. **Bartual SG, Seifert H, Hippler C, Luzon MA, Wisplinghoff H, 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.
52. **Krizova L, Poirel L, Nordmann P, Nemeč A.** 2013. TEM-1 β -lactamase as a source of resistance to sulbactam in clinical strains of *Acinetobacter baumannii*. J. Antimicrob. Chemother. **68**:2786–2791.
53. **Harakeh S, Yassine H, El-Fadel M.** 2006. Antimicrobial-resistant patterns of *Escherichia coli* and *Salmonella* strains in the aquatic Lebanese environments. Environ. Pollut. **143**:269–277.
54. **Tokajian S, Hashwa F.** 2004. Incidence of antibiotic resistance in coliforms from drinking water and their identification using the Biolog and the API identification systems. J. Chemother. **16**:45–50.
55. **Izdebski R, Fiett J, Hryniewicz W, Gniadkowski M.** 2012. Molecular analysis of *Acinetobacter baumannii* isolates from invasive infections in 2009 in Poland. J. Clin. Microbiol. **50**:3813–3815.
56. **Coelho-Souza T, Reis JN, Martins N, Martins IS, Menezes AO, Reis MG, Silva NO, Dias RC, Riley LW, Moreira BM.** 2013. Longitudinal surveillance for meningitis by *Acinetobacter* in a large urban setting in Brazil. Clin. Microbiol. Infect. **19**:E241–E244.
57. **Potron A, Munoz-Price LS, Nordmann P, Cleary T, Poirel L.** 2011. Genetic features of CTX-M-15-producing *Acinetobacter baumannii* from Haiti. Antimicrob. Agents Chemother. **55**:5946–5948.
58. **Evans BA, Amyes SG.** 2014. OXA β -Lactamases. Clin. Microbiol. Rev. **27**:241–263.

59. **Pournaras S, Gogou V, Giannouli M, Dimitroulia E, Dafopoulou K, Tsakris A, Zarrilli R.** 2014. Single locus sequence-based typing of *bla*_{OXA-51-like} gene for rapid classification of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates to international clones. *J. Clin. Microbiol.* **52**:1653–1657.
60. **Zander E, Nemec A, Seifert H, Higgins PG.** 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.
61. **Turton JF, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Pike R, Livermore DM, Pitt TL.** 2006. The role of *ISAbal* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol. Lett.* **258**:72–77.
62. **Guerra B, Fischer J, Helmuth R.** 2014. An emerging public health problem: Acquired carbapenemase-producing microorganisms are present in food-producing animals, their environment, companion animals and wild birds. *Vet. Microbiol.*
63. **Kumsa B, Socolovschi C, Parola P, Rolain J-M, Raoult D.** 2012. Molecular detection of *Acinetobacter* species in lice and keds of domestic animals in Oromia Regional State, Ethiopia. *PloS One* **7**:e52377. doi:10.1371/journal.pone.0052377.

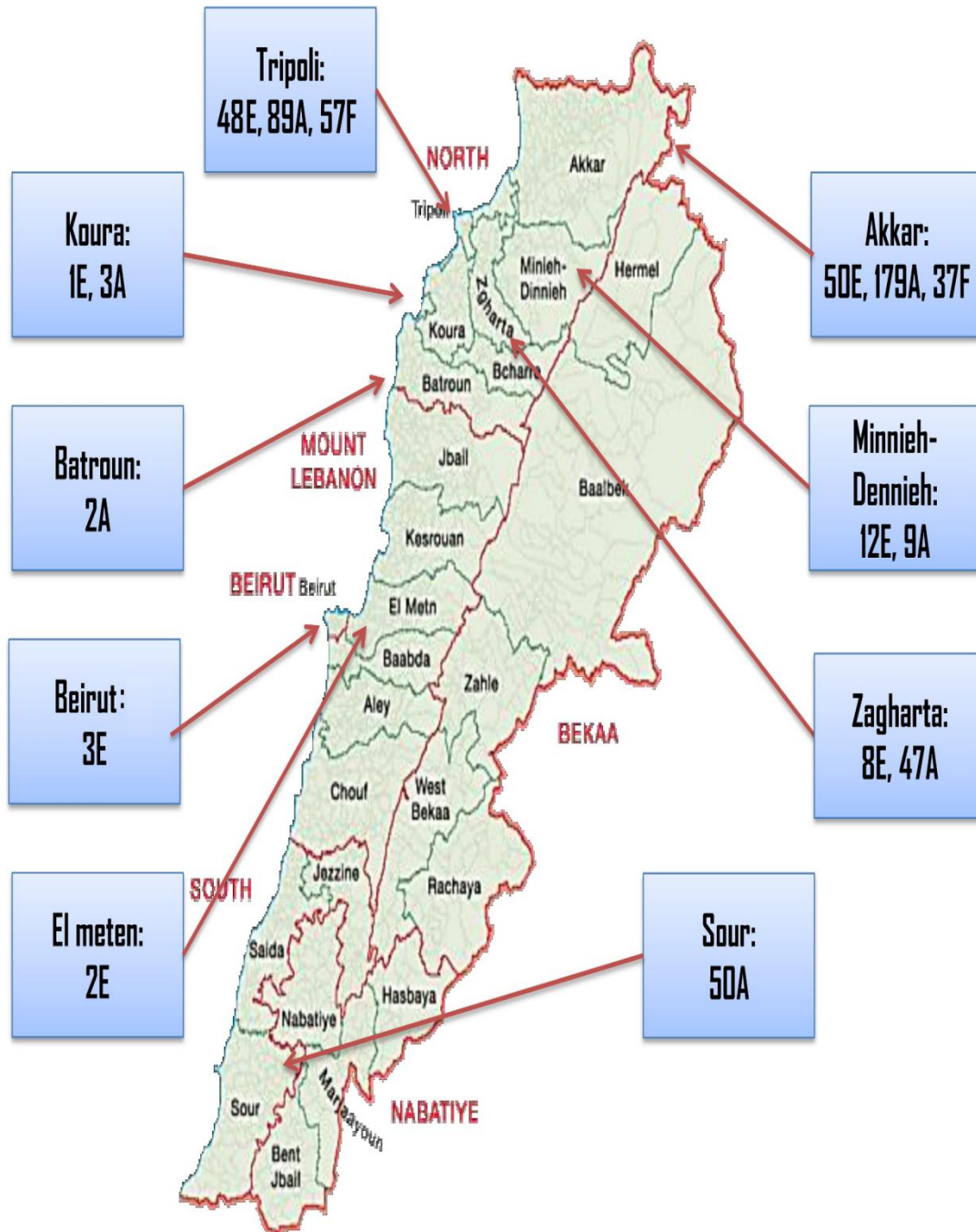


Figure 1: Lebanese geographical map representing the distribution of epidemiological samples between Lebanese districts. E for environmental samples (soil and water), A for animal samples and F for food samples (meat, milk and cheese).

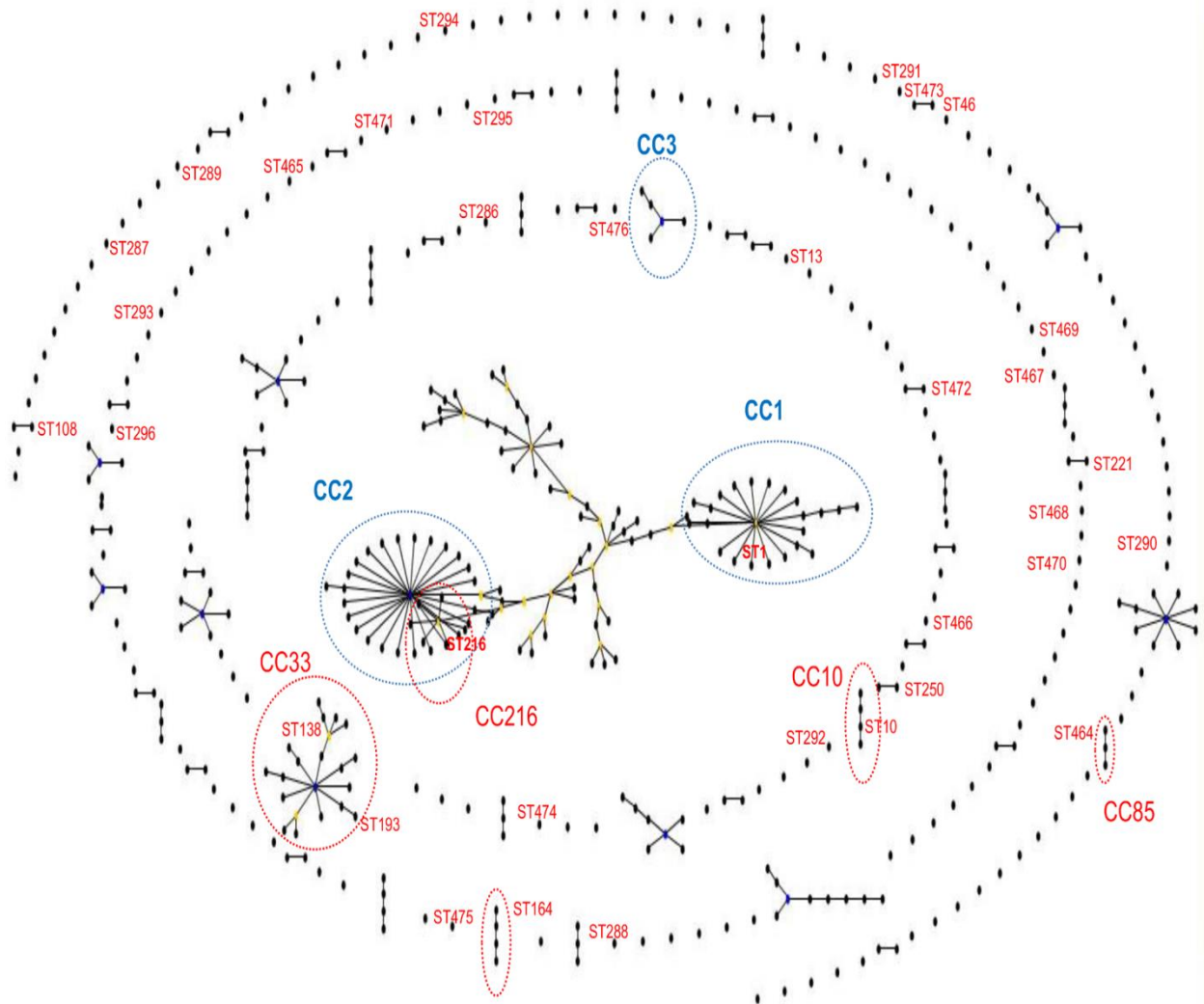


Figure 2: Population snapshot determined by eBUSRT analysis on 489 sequences present in MLST Pasteur database (last update 18.04.2014). The blue circle represent the three international clones (CC1, CC2 and CC3). The red ST(s) represent the identified sequence types in this study. A red circle means that our identified ST belonged to a clonal complex which its name is written next the circle.

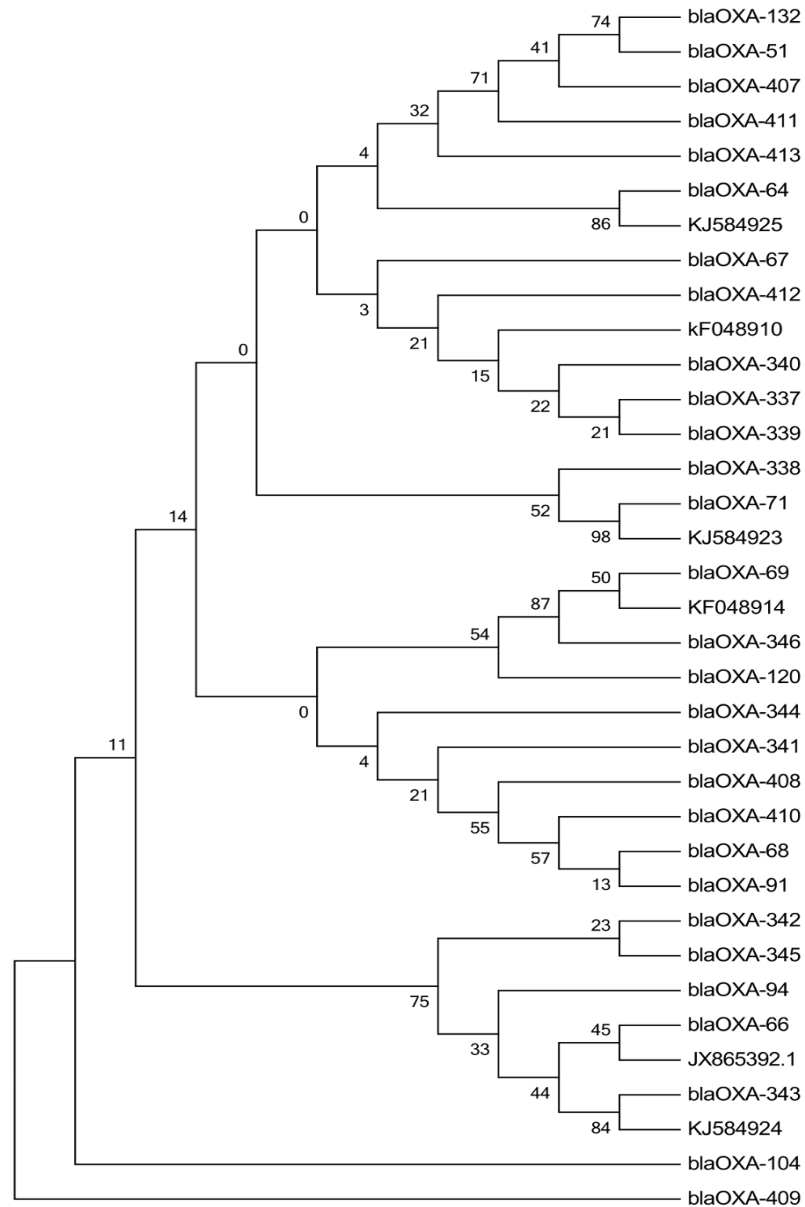


Figure 3: Maximum likelihood nucleotide tree of 35 *bla*_{OXA-51} genes. These 35 *bla*_{OXA-51} genes correspond to 34 different identified *bla*_{OXA-51} in this study and *bla*_{OXA-66} (the *bla*_{OXA-51} representative of clonal complex 2). MEGA 6 was used to build this phylogenetic tree. Bootstrap values were noted at the nodes. One thousand replicates were used to calculate bootstrap values.

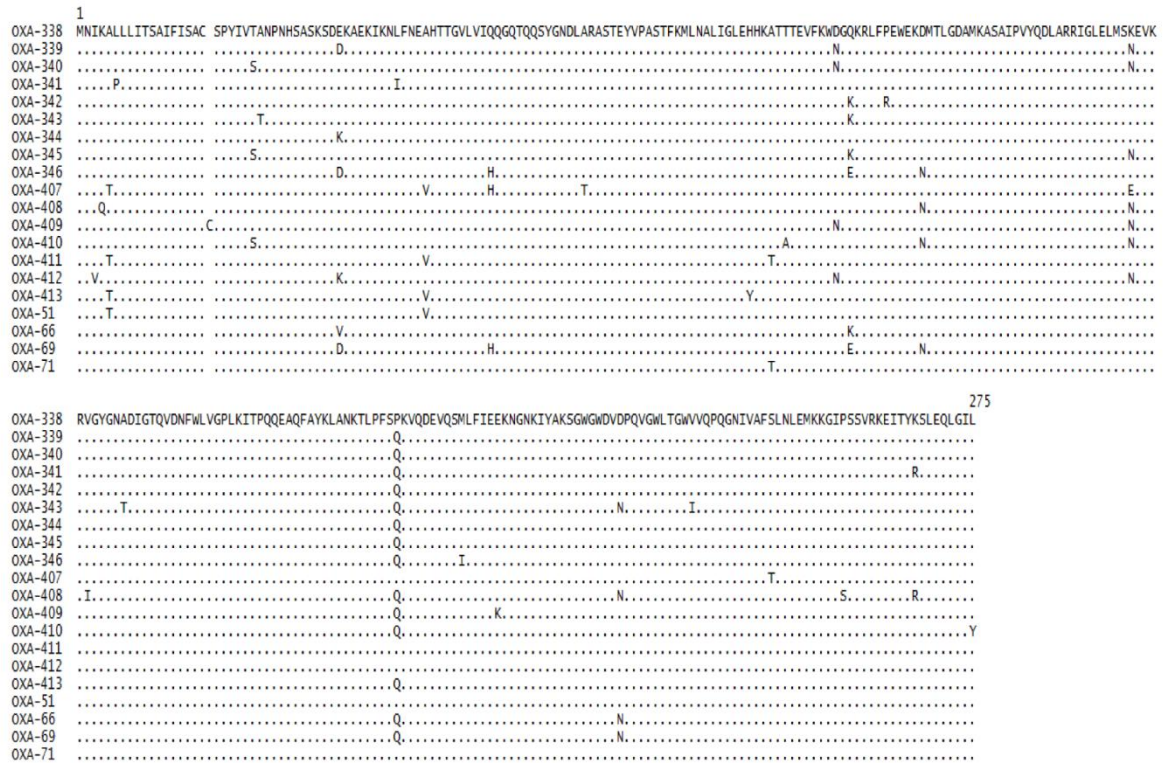


Figure 4:

Amino acid sequences alignment of 16 novel OXA-51 proteins detected in this study compared to OXA-51 (the founding member of OXA-51-like β -lactamases), OXA-66 (OXA-51 representative variant of CC2), OXA-69 (OXA-51 representative variant of CC1) and OXA-71 (OXA-51 representative variant of CC3) [58]. The protein accession number of OXA-51 (WP_002033109.1), OXA-66 (YP_001846219.1), OXA-69 (YP_001713983.1), OXA-71 (WP_001021785.1).

Table 1: Characteristics of 42 *Acinetobacter baumannii* identified strains in this study.

Nb of isolate	Origin (sample)-city	Year	ST	New alleles	OXA-51*	<i>ISAbal</i>	OXA (nb)
1	Water (artesian well)-Koura	2012	1	-	OXA-69	-	-
1	Cow (feces)-Akkar	2012	10	-	OXA-68	-	-
1	Cow (meat)-Tripoli	2012	13	-	KF048919, OXA-346	-	-
2	Cow (feces) and water (animal)-Akkar	2012	46	-	OXA-104	-	-
2	Water (sources)-Akkar	2012	108	-	OXA-132	-	-
1	Cow (feces)-Sour	2013	118	-	KJ584925, OXA-338	-	-
1	Cat (rectum)-Tripoli	2013	138	-	OXA-64	Positive	-
1	Dog (mouth)-Tripoli	2013	164	-	OXA-91	-	-
1	Cow (milk)-Akkar	2012	193	-	OXA-120	-	-
1	Cheese-Tripoli	2011	216	-	OXA-51	-	-
1	Rabbit (mouth)-Tripoli	2013	221	-	JX865392.1	-	-
1	Goat (mouth)-Tripoli	2013	250	-	KJ584916, OXA-407	-	-

2	Cow (meat and mouth)- Tripoli	2012, 2013	286	-	KF048909, OXA-338	-	-
1	Cow (meat)-Tripoli	2012	287	-	KF048910, OXA-106	-	-
1	Cow (feces)-Akkar	2012	288	-	KF048911, OXA-339	-	-
1	Cow (feces)-Akkar	2012	289	1 new allele (<i>rplB</i>)	OXA-337	-	-
1	Cow (feces)-Akkar	2012	290	1 new allele (<i>recA</i>)	KF048912, OXA-340	-	-
1	Cow (feces)-Akkar	2012	291	3 new alleles (<i>fusA, rplB, rpoB</i>)	KF048913, OXA-341	-	-
2	Cow (feces)-Akkar	2012	292	1 new allele (<i>rplB</i>)	KF048914, OXA-69	-	-
1	Cow (feces)-Akkar	2012	293	-	KF048915, OXA-342	-	-
2	Water (artesian well), horse (mouth)-Zagharta, Tripoli	2012, 2013	294	1 new allele (<i>rplB</i>)	KF048916, OXA-343	-	OXA-143 (1/2)
1	Cheese-Tripoli	2012	295	2 new alleles (<i>gltA, recA</i>)	KF048917, OXA-344	-	-
1	Cow (meat)-Tripoli	2012	296	1 new allele (<i>rpoB</i>)	KF048918, OXA-345	-	-
1	Chicken (rectum)-Tripoli	2013	464	-	OXA-94	-	-

1	Dog (rectum)-Zagharta	2013	465	1 new allele (<i>gltA</i>)	KJ584917, OXA-408	-	-
1	Cow (rectum)-Zagharta	2013	466	1 new allele (<i>cpn60</i>)	KJ584918, OXA-409	-	-
1	Dog (rectum)-Zagharta	2013	467	1 new allele (<i>gltA</i>)	KJ584919, OXA-410	-	-
1	Cat (rectum)-Tripoli	2013	468	1 new allele (<i>recA</i>)	KF048917, OXA-344	Positive	-
2	Cow, goat (mouth)-Tripoli, El Denieh	2013	469	-	OXA-71	-	-
1	Cow (mouth)-Tripoli	2013	470	-	OXA-51	-	-
1	Cow (mouth)-Tripoli	2013	471	-	KJ584920, OXA-411	-	-
1	Mule (feces)-Akkar	2013	472	-	OXA67	-	-
1	Cow (feces)-Akkar	2013	473	1 new allele (<i>fusA</i>)	KJ584921, OXA-412	-	-
1	Cow (feces)-Akkar	2013	474	2 new alleles (<i>fusA, recA</i>)	KJ584922, OXA-413	-	-
1	Donkey (feces)-Akkar	2013	475	1 new allele (<i>recA</i>)	KJ584923, OXA-71	-	-
1	Goat (feces)-Akkar	2013	476	2 new alleles (<i>fusA, recA</i>)*	KJ584924, OXA-65	-	-

The GenBank accession number is written when the nucleotide sequence coding OXA-51 protein is novel and described for the first time in this study. The novel ST or novel *bla*_{OXA-51} gene or novel OXA-51 protein were written in Bold. *The two new alleles of ST476 are the same of the ST474 but with novel allele profile. OXA for oxacillinase coding for carbapenem resistance mechanisms.

Table 2: Distribution of identified *Acinetobacter* species according to the source of sample

Species	Environmental	Food	Animal	Total
<i>A. baumannii</i>	Water: 5		Cow: 17	42
			Cat: 2	
			Horse: 1	
			Cheese: 2	
			Goat: 3	
			Meat: 4	
			Dog: 3	
			Milk: 1	
			Rabbit: 1	
			Donkey: 1	
<i>A. pittii</i>	Water: 8 Soil: 7		Cow: 14	61
			Horse: 4	
			Cheese: 6	
			Goat: 2	
			Lettuce: 4	
			Dog: 6	
			Meat: 6	
Sheep: 2				

			Rabbit: 1	
			Chicken: 1	
<i>A. calcoaceticus</i>	Soil: 1	Lettuce: 1	Goat: 2	4
			Cow: 4	
<i>A. bereziniae</i>	-	Meat: 3	Horse: 1	10
			Dog: 1	
			Pigeon: 1	
<i>A. johnsonii</i>	-	-	Rabbit: 1	1
<i>A. lwoffii</i>	-	-	Cat: 1	1
<i>A. schindleri</i>	-	-	Cat: 3	3
<i>A. radioresistens</i>	-	-	Cat: 1	1
<i>A. beijerinckii</i>	-	-	Cow: 1	1
<i>A. junii</i>	-	-	Cat: 1	1
<i>A. soli</i>	-	Lettuce: 1	-	1
<i>A. gernerii</i>	-	-	Goat: 1	1
Gen.sp.15 TU	-	-	Cow: 2	4

			Cat: 1	
			Dog: 1	
			Cow: 20	
			Horse: 2	
Putative novel species	Soil: 1	Meat: 1	Dog: 1	30
			Sheep: 3	
			Goose: 1	
			Pig: 1	
Total	22	29	110	161

Commentaires

Dans cette étude, nous avons mis en évidence pour la première fois la présence extra-hospitalière d'*A. baumannii* au Liban, par analyse de divers systèmes écologiques. *A. baumannii* a été identifié dans 6,9 % des prélèvements d'eau, dans 2,7 % des prélèvements de lait, 8,0 % des prélèvements de viande, 14,3 % des prélèvements de fromage et 7,7 % des prélèvements effectués chez les animaux. Alors que *A. baumannii* n'a pas été identifié dans aucun échantillon du sol analysé.

La structure de la population étudiée par la méthode de référence MLST a révélé la présence chez les 42 souches identifiées de 36 séquençotypes (ST) différents dont 24 étaient des ST(s) décrits pour la première fois dans cette étude. Ces résultats ont permis de donner une image réelle de la population à l'extérieur des hôpitaux en mettant en lumière deux types de populations: 1) une population de souches similaires aux souches humaines a été identifiée, à l'image du ST1 et du ST10 (Diancourt et al., 2010). Ces résultats sont en accord avec les observations de Belmonte *et al.*, qui ont identifié le clone chez les animaux domestiques dans l'Ile de Réunion également décrit chez l'homme (ST25) ou encore les observations de Hrenovic *et al.*, qui ont identifié en Croatie (Hrenovic et al., 2014) une souche environnementale similaire à une souche clinique (87 % d'homologie en champ pulsé) et appartenant au clone international 1. Ces observations laissent supposer que l'environnement pourrait former une nouvelle source d'infection. 2) Une population de nouveaux ST(s), très différents de ceux déjà connus et retrouvés principalement chez de souches isolées chez les animaux. Ce résultat pourrait refléter la probabilité de l'existence d'un pool de souches spécifiques à ces hôtes. L'analyse de génome de la souche sensible SDF, souche de poux de corps, a montré des capacités métaboliques moins élevées de cette souche par rapport à la souche clinique AYE suggérant une adaptation spécifique de SDF à l'environnement (Fournier et al., 2006; Vallenet et al., 2008).

L'analyse des variants du gène *bla_{OXA-51-like}* a démontré la présence de 34 variants, dont 21 étaient de nouveaux variants. Ces résultats rejoignent ceux retrouvés par MLST et soulignant l'utilité du séquençage du gène *bla_{OXA-51-like}* pour le typage des souches environnementales.

Toutes les souches identifiées excepté une étaient sensibles aux carbapénèmes. La seule souche résistante aux carbapénèmes possédait le gène *bla_{OXA-143}* et avait un bas niveau de

résistance (Higgins et al., 2009), soulignant ainsi le rôle des réservoirs extra-hospitaliers dans l'émergence de nouvelle carbapénèmase.

En conclusion, les animaux peuvent former un réservoir potentiel d'*A. baumannii*. La présence de ces nouveaux ST(s) en pathologie humaine, notamment dans les infections communautaires, doit être recherchée dans des études ultérieures, mais également les différentes interactions possibles entre ces deux hôtes (humain et animal) pouvant aboutir à la colonisation ou l'infection de l'homme.

Discussion générale

Pour permettre une meilleure compréhension de la pathogénicité d'une bactérie, il est nécessaire de connaître son épidémiologie au sein des institutions médicales où l'utilisation des antibiotiques peut favoriser l'adaptation et l'émergence de certains clones. Il est également nécessaire de bien caractériser son épidémiologie à l'extérieur des hôpitaux, d'établir sa ou ses niches écologiques, la répartition des clones circulants, son comportement dans différentes conditions environnementales, et enfin, ses interactions avec l'hôte. Concernant *A. baumannii*, bien que son épidémiologie hospitalière soit bien dessinée, celle en dehors des hôpitaux reste peu connue. Dans ce travail, nous avons tenté d'apporter des éléments de réponse à travers l'étude de souches isolées dans l'environnement extra-hospitalier sur le territoire libanais et la comparaison de ces souches à celles isolées de patients. Ce travail, qui est un travail préliminaire, a pour objectif principal l'amélioration de notre connaissance à l'égard de l'écologie de cette bactérie.

Pour mieux comprendre l'épidémiologie de cette bactérie, des techniques moléculaires de typage ont été développées. Dans le chapitre 2, nous avons comparé l'efficacité de quatre méthodes de typage : le PFGE, la MLST, le séquençage du gène *bla_{OXA-51}* et la rep-PCR à l'aide du DiversiLab. Nous avons conclu que le PFGE demeurerait la technique de référence pour les enquêtes épidémiologiques d'*A. baumannii*. Nous avons cependant montré une concordance assez bonne entre la technique de typage par DiversiLab et celle par PFGE. Dans une étude réalisée par Saeed *et al.*, (Saeed *et al.*, 2006), il a été montré une capacité discriminatoire comparable entre la rep-PCR et le PFGE, avec toutefois une discordance mineure sur une souche. Grisold *et al.*, ont quant à eux obtenus une concordance de 100 % entre les deux techniques lors d'une étude portant sur des souches isolées de deux épidémies survenues dans leurs hôpitaux (Grisold *et al.*, 2010). D'autres études ont rapporté des discordances entre ces deux techniques (Maâtallah *et al.*, 2013; Schuetz *et al.*, 2012), indiquant que le remplacement du PFGE par le DiversiLab dans l'investigation des épidémies à *A. baumannii* ne devait pouvoir être envisagé qu'après évaluation par des études complémentaires. En ce qui concerne le typage par MLST, nous avons préféré le schéma de l'Institut Pasteur (Diancourt *et al.*, 2010) à celui de Bartual pour réaliser nos analyses

(Hamouda et al., 2010; Park et al., 2009), ce dernier étudiant des *loci* soumis à des recombinaisons. Le typage de nos souches par MLST nous a permis de mettre nos données dans un contexte global et d'assigner directement nos isolats cliniques et environnementaux à des complexes clonaux et/ ou des séquence-types définis. Toutefois, cette technique est fastidieuse et coûteuse. Alternativement, le séquençage d'un seul gène, le gène entier *bla*_{OXA-51} "*bla*_{OXA-51} SBT", a été suggéré comme technique de typage. Nous avons séquencé ce gène et nos résultats se sont révélés intéressants, puisque nous avons correctement identifié tous nos isolats cliniques et tous nos isolats environnementaux à l'exception (chapitre 2, 3 et 4) de la souche de ST469, pour laquelle nous avons identifié le variant *bla*_{OXA-71} connu pour être le variant présent dans le Complexe Clonal 3 et de la souche de ST138, pour laquelle nous avons identifié le variant *bla*_{OXA-64} connu pour être le variant présent dans le Complexe Clonal 25. Nous avons également identifié le même variant *bla*_{OXA-51} chez deux souches animales de ST216 et ST470, le variant *bla*_{OXA-344} chez deux souches animales de ST295 et ST468 et les variants KF048914, KJ584924, *bla*_{OXA-337} chez des souches animales et cliniques (chapitre 2, 3 et 4). Toutefois, cette concordance observée entre les ST(s) et les variants *bla*_{OXA-51-like} suggère une coévolution parallèle du gène *bla*_{OXA-51-like} avec les gènes de ménage (Evans, 2010). Une autre hypothèse suggère que la diversité enzymatique est le fait de la pression sélective exercée par l'utilisation des antibiotiques et que ces enzymes, bien qu'inexpressives, jouent un rôle dans la résistance (Evans and Amyes, 2014). Le rôle de cette diversité devra toutefois être prouvé dans des études ultérieures.

Quelle est l'épidémiologie hospitalière au Liban? Dans ce périmètre, les clones isolés sont-ils identiques aux clones déjà identifiés mondialement ou ont-ils une distribution bien particulière?

Au Liban, les études épidémiologiques hospitalières restent limitées. Des épidémies associées aux trois clones internationaux ont été décrites entre 2004 et 2007, mais uniquement à Beyrouth. Les souches d'*A. baumannii* étaient pour bon nombre d'entre elles résistantes aux carbapénèmes et le seul gène décrit à cette époque était le gène *bla*_{OXA-58 like} (Di Popolo et al., 2011; Giannouli et al., 2009; Zarrilli et al., 2008). Nous avons voulu caractériser l'épidémiologie de cette bactérie sur une collection de 147 souches isolées majoritairement entre les années 2009-2013 dans différents hôpitaux du Nord Liban et à Beyrouth. Le clone

international 2 était le clone dominant (70 % des souches), rejoignant ainsi la situation mondiale actuelle où un shift vers ce clone a été observé (Grosso et al., 2011b; Higgins et al., 2010a; Karah et al., 2012). Par ailleurs, la majorité de nos souches étaient résistantes aux carbapénèmes et le gène de résistance prédominant était le gène *bla*_{OXA-23 like}, comme décrit ailleurs (Fu et al., 2010). Nous avons retrouvé un même clone, le clone PFGEA'/ST2, distribué à la fois à Tripoli et à Beyrouth. Cette observation n'est pas différente de celle des autres pays. A titre d'exemple, le Royaume-Uni a connu jusqu'à la fin de 2007 un même clone défini par champ pulsé et réparti dans environ 60 hôpitaux (Turton et al., 2009). Ainsi, peut-on être amené à se demander si ce clone identifié dans notre étude (chapitre 2) est un clone bien particulier et spécifique du Liban. Ces questions représentent des nouvelles perspectives à évoquer dans de prochaines études.

Au-delà du clone international 2 (qui regroupe le ST2 et ses variants), d'autres clones bien connus mondialement ont été identifiés au Liban comme le clone international 1 (regroupant le ST1 et ses variants), le ST25 et le ST85. Le clone international 1 était le deuxième clone dominant dans nos résultats (chapitre 3), comme cela est d'ailleurs le cas dans le reste du monde. Il est actuellement rapporté dans près de 31 pays en Europe, Asie, Afrique, Moyen-Orient, Australie, Etats-Unis et Amérique du Sud (Karah et al., 2012). Le ST25 est un clone émergent détecté en Europe, Asie, Afrique et Amérique. Il a récemment été nommé clone international 7 (Higgins et al., 2010a; Karah et al., 2012; Revathi et al., 2013; Stietz et al., 2013). Des souches d'*A. baumannii* de ST25 et productrices de la carbapénémase NDM-1 ont été identifiées en Allemagne et au Kenya (Bonnin et al., 2012; Pfeifer et al., 2011; Revathi et al., 2013). Notre souche libanaise productrice de NDM-1 appartenait également à ce clone. Quant au ST85, il a été identifié pour la première fois en Grèce, puis en France, chez des souches productrices de la carbapénémase NDM-1 et importées généralement du Nord de l'Afrique, en Espagne et au Liban (Bonnin et al., 2013a; Decousser et al., 2013; Gogou et al., 2011; Mosqueda et al., 2013; Rafei et al., 2014). Dans notre cas, nous n'avons pas détecté de clone épidémique bien spécifiques du Liban, comme cela avait été décrit en Italie avec l'isolement du clone épidémique ST78 (Giannouli et al., 2010; Principe et al., 2014).

La majorité des souches cliniques ayant des ST(s) différents de ceux cités ci-dessus sont des souches sensibles, sporadiques et isolées généralement des urines. La diversité des ST(s) chez les souches non épidémiques est également observée ailleurs. Ainsi, au Japon, parmi 15 souches non épidémiques décrites dans une étude, 13 ST(s) différents ont été observés dont les ST103 et ST150 que nous avons également identifiés dans nos travaux (Matsui et al.,

2014). Au Moyen-Orient, la présence de souches de ST103 porteuses du gène *bla*_{NDM-2} a été rapportée (Espinal et al., 2013).

Les souches épidémiques sont globalement plus résistantes aux antibiotiques, en particulier aux carbapénèmes, par rapport aux souches non épidémiques (Matsui et al., 2014). Tous nos ST(s) non épidémiques sauf ST154 étaient dépourvus de la séquence d'insertion *ISAbal* (Wright et al., 2014).

Le pourcentage élevé de la résistance aux carbapénèmes (97/147, 66 %) ne peut pas refléter la prévalence réelle de la résistance aux carbapénèmes chez *A. baumannii* au Liban, car notre étude n'a pas porté sur tous les isolats collectés dans les hôpitaux. En effet, bon nombre de ces isolats ont été collectés durant des contextes épidémiques, notamment suite à l'accueil de patients syriens dans les hôpitaux tripolitains. Hamouche et Sarkis avaient rapporté dans la seule étude réalisée à Beyrouth une diminution dramatique des souches sensibles à l'imipénème, allant de 95,3 % de souches sensibles en 2006, à 44,6 % en 2009 (Hamouche and Sarkis, 2012). Ces résultats et les nôtres sont en accord avec ceux observés ailleurs, où des pourcentages élevés de souches résistantes aux carbapénèmes sont retrouvés dans les hôpitaux du Moyen-Orient et du Nord Afrique: 66 % en Syrie (Hamzeh et al., 2012); 84,5 % en Iran (Hojabri et al., 2014), 70 % en Egypte (Al-Agamy et al., 2014a), 63,6 % en Saoudia Arabie (Al-Agamy et al., 2014b), 48 % en Algérie (Bakour et al., 2013), 47 % en Tunisie (Ben Othman et al., 2011).

Nous avons identifié deux souches productrices d'OXA-58 à Beyrouth, et une souche productrice d'OXA-24 à Tripoli, mais le gène codant pour la carbapénémase OXA-23 (89/97 souches) est prédominant et semble avoir une situation endémique à la fois à Tripoli et Beyrouth. De façon similaire, dans plusieurs pays, il a été observé le remplacement des souches possédant les carbapénémases OXA-58 (Italie) et OXA-24 (Espagne et Portugal) par des souches possédant l'OXA-23 (Grosso et al., 2011b; Minandri et al., 2012; Mosqueda et al., 2013). De façon alarmante, nous avons également rapporté la première identification de la métallo- β -lactamase NDM-1 chez *A. baumannii* au Liban. Cette détection inquiétante demande la mise en place de procédures de dépistage systématiques.

Enfin, nous avons conduit une étude de dépistage systématique de la colonisation par *Acinetobacter* lors d'une épidémie survenue dans le service de soins intensifs d'un hôpital de septembre à début octobre. Des écouvillonnages rectaux, nasaux et axillaires ont été réalisés sur 36 patients au moment de leur admission et au cours de leur séjour hospitalier. Des

prélèvements de selles et/ou des écouvillonnages axillaires ont également été réalisés sur 13 personnels de santé travaillant dans le service des soins intensifs. Au total, 228 prélèvements ont été analysés. Des prélèvements positifs ont été identifiés chez 9 patients et un personnel de santé. Cinq isolats avec le même profil épidémique et avec une résistance à tous les antibiotiques sauf à la colistine et la rifampicine ont été retrouvés. Ces isolats appartenaient au clone international 2. Tous les prélèvements environnementaux réalisés dans les hôpitaux ont été négatifs. A côté de cela, deux souches sauvages ont été isolées d'un prélèvement rectal de 2 patients. Ces souches possédaient deux ST(s) différents (ST241, ST164), mais appartenant à un même CC formé de 4 ST(s) qui sont les 137, 241, 317, 164 et qui possèdent le même variant de la séquence *bla*_{OXA-51} (*bla*_{OXA-91}). La répartition de ce complexe clonal dans la communauté peut former une nouvelle perspective qui mérite d'être étudiée.

Quelle est l'épidémiologie extra-hospitalière au Liban?

Dans le chapitre 4, nous avons apporté des éléments essentiels pour affirmer la présence extra-hospitalière d'*A. baumannii* et pour comprendre la structure de cette population dans différentes conditions environnementales par typage par MLST, une technique rarement utilisée jusqu'à présent pour la caractérisation des souches extra-hospitalières (Belmonte et al., 2014). Alors que la présence de la bactérie dans le sol est bien documentée notamment en zone tropicale et dans les sols pollués d'hydrocarbures pétroliers, nous n'avons pas réussi à isoler une seule souche d'*A. baumannii* dans tous nos prélèvements de sol (Houang et al., 2001; Obuekwe et al., 2009; Sarma et al., 2004). En Allemagne, seul un échantillon de sol était positif pour *A. baumannii* sur 163 prélèvements effectués (Seifert and Dijkshoorn, 2008) et en Corée, aucun prélèvement de sol était positif pour *A. baumannii* (Choi et al., 2012). D'après nos résultats, il apparaîtrait qu'*A. baumannii* n'est pas une espèce typiquement tellurique au Nord Liban, mais ces observations sont à tempérer puisque nous n'avons pas pris en compte l'effet de la saison et les caractéristiques biochimiques du sol.

Chez les animaux, des études conduites en Ecosse, au Sénégal et sur l'île de la Réunion ont montré la présence d'*A. baumannii* dans la flore (Belmonte et al., 2014; Hamouda et al., 2011; Kempf et al., 2012b). Nous avons également isolé *A. baumannii* dans la flore des animaux de compagnie, avec un pourcentage plus élevé (7,7 %) que ceux habituellement

décrits dans la littérature, et dans les aliments d'origine animale (lait...). Néanmoins, cette étude souffre d'un manque de données sur les animaux étudiés, notamment sur l'utilisation ou non d'un traitement antibiotique.

Au-delà des animaux, la présence d'*A. baumannii* dans les eaux de puits et des sources d'eau naturelle est une grande préoccupation. Est-ce que *A. baumannii* se trouve naturellement dans cette niche écologique, ou bien sa présence est-elle le reflet d'une contamination humaine ou animale comme celle que l'on peut observer avec les coliformes dans les eaux libanaises (Harakeh et al., 2006; Tokajian and Hashwa, 2004)? Dans notre étude nous avons identifié une souche d'*A. baumannii* présentant un nouveau ST (ST294) à la fois dans l'eau d'un puits artésien et dans la gueule d'un cheval...

L'étude par MLST de la population environnementale d'*A. baumannii* nous a permis d'identifier globalement deux types de populations, celle déjà bien identifiée en pathologie humaine et celle composée de ST jamais décrits encore. Parmi les clones déjà identifiés, nous avons détecté le clone international 1 dans de l'eau d'un puits artésien. Le complexe clonal 10 en MLST, connu sous le nom de clone international 8 et décrit en Amérique, en Australie et en Europe, a été détecté dans nos études dans des selles de bœuf (Ahmed-Bentley et al., 2013; Diancourt et al., 2010; Higgins et al., 2010a; Karah et al., 2012). Le ST164, isolé dans la gueule d'un chien ainsi que lors d'un dépistage rectal chez patient a également été décrit dans des cas de méningites au Brésil (Coelho-Souza et al., 2013). Le ST193, isolé dans nos prélèvements de lait cru de vache a été décrit comme étant impliqué dans des infections invasives en Pologne (Izdebski et al., 2012). En outre, certains des clones identifiés dans nos réservoirs extra-hospitaliers ont également été isolés d'urines (ST46 et ST108) ou d'escarre (ST1) chez des patients libanais. L'infection urinaire causée par la souche de ST46 ainsi que l'escarre (ST1) ont été considérées comme des infections communautaires, isolées chez des patients externes ou au moment de leur admission, ce qui ouvre des questions sur l'origine de ces souches et sur la capacité des interactions entre les différentes niches écologiques.

Certains clones identifiés dans nos études ont été associés à des nouveaux contextes infectieux ailleurs dans le monde. Ainsi, le ST118 a été décrit pour la première fois dans une plaie d'un patient blessé dans le tremblement de terre de Haïti en 2010, cette souche était productrice de la BLSE CTX-M-15 (Potron et al., 2011). Le clone ST85 producteur de NDM-1 a été isolé dans un contexte de guerre et nous ne l'avons pas détecté dans l'environnement extra-hospitalier au Liban. L'origine de l'acquisition de cette souche n'est pas claire. Elle a pu

être acquise à partir de sources environnementales sur le champ de bataille, pendant le séjour du patient dans la clinique syrienne ou lors de l'évacuation vers le Liban. Enfin, le clone ST109 isolé d'une plaie d'un patient rapatrié en Suède suite au tsunami en Thaïlande (Karah et al., 2011a) a été également isolé de bovins en Suisse, ce qui interroge sur l'implication des réservoirs extra-hospitaliers dans ce type d'infections.

D'autres clones extra-hospitaliers similaires aux clones isolés chez l'homme sont également documentés dans la littérature. Dans une étude portant sur la prévalence d'*A. baumannii* chez les animaux domestiques de l'Ile de la Réunion, Belmonte et ses collègues ont trouvé un même clone (> 90 % de similarité en champ pulsé) appartenant au ST25 chez 8 animaux parmi 9 porteurs de la bactérie, sur un total de 134 animaux prélevés. Les cliniques vétérinaires dans lesquelles les animaux ont été prélevés étant localisées tout autour de l'Ile, le contexte épidémique a été exclu (Belmonte et al., 2014). Pour autant, pour expliquer l'homogénéité de ce clone, les auteurs ont supposé l'existence d'un réservoir chez les animaux errants (particulièrement chez les chiens), la colonisation des animaux domestiques pourrait alors être expliquée par des nombreux contacts et des combats entre les animaux.

La plupart de ST(s) isolés dans un contexte extra-hospitalier, et surtout les nouveaux ST(s) sont très différents de ceux impliqués en pathologie humaine. Ils ont été identifiés chez les animaux et dans des aliments d'origine animale. Cette diversité est également retrouvée dans le gène *bla*_{OXA-51} où 21 nouveaux variants ont été identifiés chez des souches d'origine animale. Hamouda et ses collègues ont fait des observations similaires en 2011 où ils avaient mis en évidence 3 nouveaux variants du gène *bla*_{OXA-51} (*bla*_{OXA-148}, *bla*_{OXA-149}, *bla*_{OXA-150}) chez les bovins (Hamouda et al., 2011). Ces résultats peuvent refléter l'existence d'un large éventail de souches intrinsèques aux animaux et une niche potentiellement animale. Dans la base de données MLST de l'Institut Pasteur, nous avons observé que parmi les 495 ST(s) présents (date de dernière mise à jour 18.06.2014), près de 68 ST(s) étaient associés à des souches d'*A. baumannii* d'origine animale et que plus de la moitié d'entre eux étaient des singletons comme ST17 qui est le ST de la souche SDF isolée de poux de corps (Fournier et al., 2006; Vallenet et al., 2008). Par ailleurs, il est intéressant de noter que certains CC(s) de la base MLST sont formés uniquement de ST(s) d'origine animale comme le cas par exemple du CC347, formé des ST346, ST347 et ST353 isolés de poulet en Suisse. Inversement, certains ST(s) d'origine extra-hospitalière forment des CC(s) avec des ST(s) déjà identifiés en pathologie humaine comme cela est le cas pour le ST138, isolé d'une urine chez un patient hospitalisé à Taiwan, et identifié dans nos travaux d'un prélèvement rectal de chat.

Nous avons proposé dans la [figure 9](#) une répartition en 4 zones des séquences types détectés au Liban: les ST(s) isolés d'infections chez l'homme, les ST(s) isolés d'animaux, les ST(s) isolés dans l'environnement extra-hospitalier et les ST(s) isolés de colonisation à l'hôpital. Certains ST(s) sont détectés à la fois dans des échantillons cliniques et dans des réservoirs extra-hospitaliers. Certains ST(s) ont une niche particulièrement écologique ou seulement hospitalière comme ST2. Par ailleurs, on ne connaît pas encore l'implication des nouveaux ST(s) identifiés dans les infections cliniques. La caractérisation des intersections entre les différentes zones pourrait participer à la compréhension de l'écologie et de la pathogénicité de cette bactérie.

Dans nos travaux, nous avons montré que la majorité des souches d'*A. baumannii* isolées de l'environnement extra-hospitalier ne possédait pas la séquence d'insertion IS*Abal*. Nous avons cependant identifié une souche possédant le gène codant la carbapénémase OXA-143, elle était isolée d'un prélèvement de gueule d'un cheval. Par ailleurs, nous avons retrouvé une souche d'*A. pittii* porteuse du gène codant la carbapénémase OXA-24 dans la gueule d'un lapin (chapitre 4). Ces données sont importantes, d'autant que la souche OXA-143 isolée du cheval était de ST294, ST identique à celui de la souche retrouvée dans un puits artésien dédié à l'utilisation humaine, mais non productrice de l'OXA-143. La présence de souches résistantes aux carbapénèmes a bien été documentée chez les animaux. Ainsi, des souches d'*A. baumannii* productrices de NDM-1 ont été isolées de porcs en Chine (Zhang et al., 2013), des *Acinetobacter* spp producteurs d'OXA-23 ont été isolés de chevaux en Belgique, et de bovins en France (Poirel et al., 2012; Smet et al., 2012). La prévalence du gène *bla*_{OXA-143} n'est pas encore définie. Ce gène a été identifié chez des souches d'*A. baumannii* au Brésil et en Corée (Kim et al., 2010; Mostachio et al., 2012), mais également chez des souches d'*A. pittii* ou encore d'*A. nosocomialis* (Ji et al., 2014; Lee et al., 2013). A notre connaissance, c'est la première détection mondiale de ce gène dans la région méditerranée.

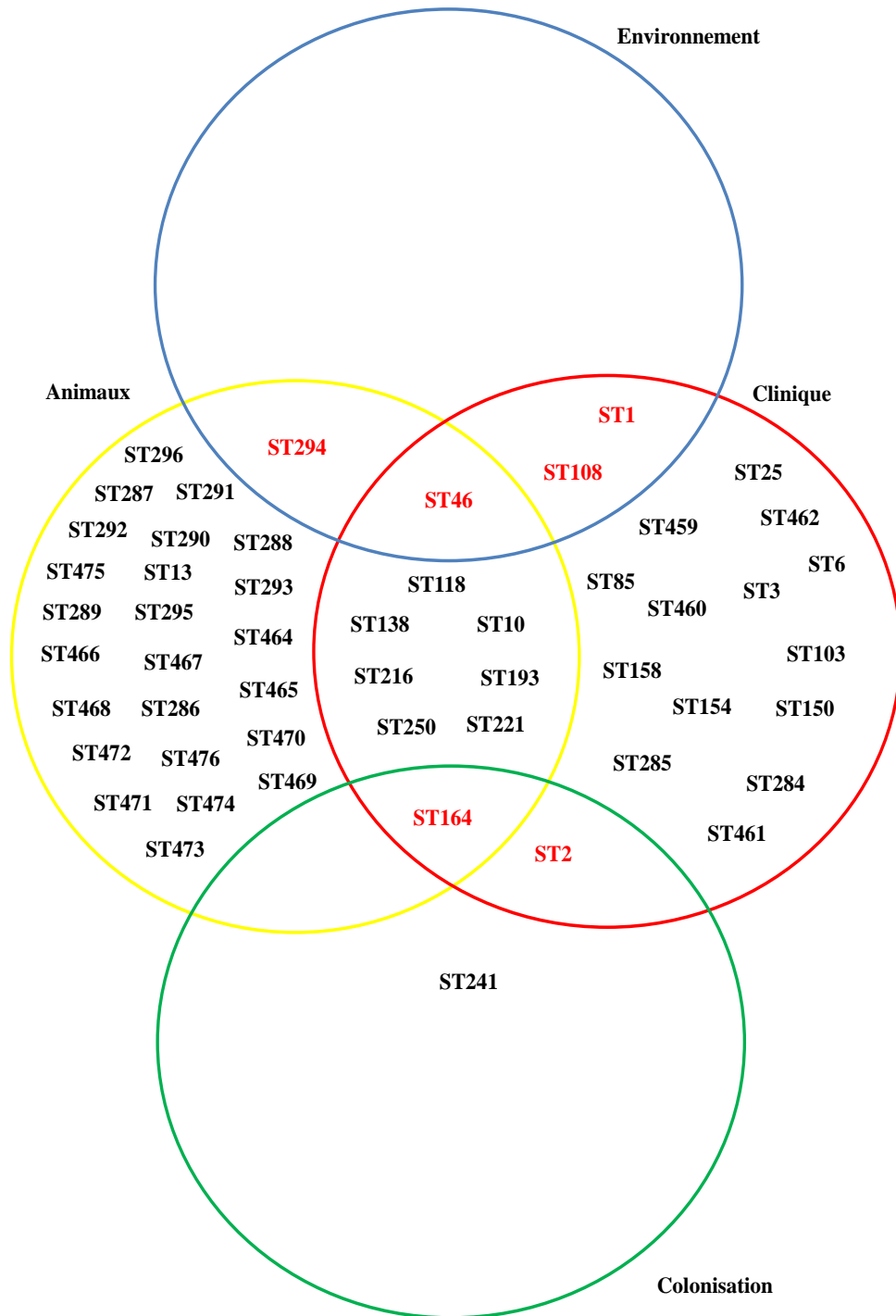


Figure 9 : Répartition en 4 groupes des séquence-types identifiés dans cette étude : encerclés en rouge, les ST isolés dans un contexte clinique, encerclés en jaune, ceux isolés des animaux, encerclés en bleu, ceux isolés de l'environnement et encerclés en vert, les ST isolés lors de dépistage (colonisation). L'intersection entre les cercles signifie qu'un ST a été détecté dans deux groupes; en se basant sur la littérature (couleur noire) ou sur nos résultats (couleur rouge gras)

Conclusion

Nos études sont les premières au Liban visant à analyser l'épidémiologie d'une collection bien caractérisée de souches d'*A. baumannii* isolées dans différentes conditions environnementales. Pour les souches isolées en clinique humaine, la majorité était multirésistante aux antibiotiques, c'est-à-dire avec une résistance à plus de 3 familles d'antibiotiques. Notre travail est également le premier à mettre en évidence des souches possédant les gènes de résistance *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{NDM-1} au Liban. La résistance aux carbapénèmes dans ce pays est principalement due à la présence du gène *bla*_{OXA-23}, comme cela a été décrit ailleurs dans le monde. Les autres gènes, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-58} sont présents mais en plus faible prévalence.

Les techniques de typage effectuées sur les différentes souches (MLST, séquençage du gène *bla*_{OXA-51}, DiversiLab®, PFGE) ont montré une large prédominance du clone international 2 dans les deux villes Libanaises (Beyrouth et Tripoli). C'est également le clone qui comportait la majorité des souches résistantes aux carbapénèmes par production de l'oxacillinase 23. Dix-sept autres ST(s), dont 6 nouveaux ST ont été identifiés.

Concernant les souches d'origine extra-hospitalière, une population non clonale sensible à la plupart des antibiotiques a été mise en évidence. Néanmoins, une souche ayant un bas niveau de résistance aux carbapénèmes et productrice d'OXA-143 a été identifiée chez un cheval.

Au total, le typage par MLST nous a permis d'identifier 36 ST(s) (dont 24 nouveaux) et le séquençage du gène *bla*_{OXA-51} ont permis de mettre en évidence 34 variants différents du gène (dont 21 nouveaux) chez les 42 souches analysées dans un contexte extra-hospitalier. Parmi les clones déjà identifiés, certains sont bien connus pour leur rôle dans la pathologie humaine comme le clone international 1 et le complexe clonal 10. Les clones circulants dans l'environnement sont généralement différents de ceux isolés lors des infections humaines. Cette étude montre l'existence d'une niche potentiellement animale. Cette étude nous a permis d'améliorer notre connaissance sur l'écologie d'*A. baumannii*. Néanmoins, ce travail ne constitue qu'une première avancée vers la connaissance d'un réservoir primaire qui reste

encore mal défini. D'autres études croisées comme celles que nous avons diligentées sur l'environnement, le monde animalier et humain, mais de plus grande dimension, devraient être réalisées pour obtenir cette réponse.

Des nouvelles perspectives qui se posent maintenant:

- ✓ Ces nouveaux ST(s) découverts dans les prélèvements environnementaux et animaux, ont-ils un rôle en pathologie humaine et en particulier dans les infections communautaires? Nos données cliniques ne sont pas exhaustives et souffrent de manque d'informations cliniques pour un nombre des souches étudiées. Des études prospectives suivantes en élargissant le nombre des isolats et en collectant le maximum d'information sont nécessaires.
- ✓ Est-ce que certains clones observés en pathologie humaine comme le clone international 2 ont une écologie hospitalière unique? Leur présence dans des réservoirs extra-hospitaliers n'ayant pas été observés, ont-ils une écologie méconnue jusqu'à ce jour?
- ✓ Est-ce que les nouveaux ST(s) ont tous les éléments nécessaires pour leur émergence en pathologie humaine ou représentent-ils seulement une niche écologique bien limités? Pour répondre à cette question, un séquençage génomique de toutes les souches est prévu dans un prochain travail.
- ✓ Quel est la prévalence de portage d'*A. baumannii* sur la peau et dans les selles de la communauté? Quel sont les clones circulants? Dans quels contextes une colonisation peut-elle aboutir à une infection? Pour répondre à cette question. Il conviendrait d'établir une étude de portage d'*A. baumannii* dans la communauté ainsi que dans les hôpitaux
- ✓ Quels sont l'origine et le rôle de la diversité du gène *bla*_{OXA-51}?
- ✓ Les nouvelles souches *Acinetobacter* spp détectées dans cette étude font l'objet d'une nouvelle étude avec l'équipe de M. Alexandre Nemeč de la République Tchèque pour caractériser et nommer les nouvelles espèces identifiées dans la présente thèse.

Références

- Adams-Haduch, J.M., Onuoha, E.O., Bogdanovich, T., Tian, G.B., Marschall, J., Urban, C.M., Spellberg, B.J., Rhee, D., Halstead, D.C., Pasculle, A.W., Doi, Y., 2011. Molecular epidemiology of carbapenem-nonsusceptible *Acinetobacter baumannii* in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 49, 3849–3854. doi:10.1128/JCM.00619-11
- Adékambi, T., Drancourt, M., Raoult, D., 2009. The *rpoB* gene as a tool for clinical microbiologists. *Trends Microbiol.* 17, 37–45. doi:10.1016/j.tim.2008.09.008
- Ahmed-Bentley, J., Chandran, A.U., Joffe, A.M., French, D., Peirano, G., Pitout, J.D., 2013. Gram-negative bacteria that produce carbapenemases causing death attributed to recent foreign hospitalization. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 3085–3091. doi:10.1128/AAC.00297-13
- Ajao, A.O., Robinson, G., Lee, M.S., Ranke, T.D., Venezia, R.A., Furuno, J.P., Harris, A.D., 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.* 30, 1425–1430. doi:10.1007/s10096-011-1237-7
- Al-Agamy, M.H., Khalaf, N.G., Tawfick, M.M., Shibl, A.M., El Kholly, A., 2014a. Molecular characterization of carbapenem-insensitive *Acinetobacter baumannii* in Egypt. *Int. J. Infect. Dis.* 22, 49–54. doi:10.1016/j.ijid.2013.12.004
- Al-Agamy, M.H., Shibl, A.M., Ali, M.S., Khubnani, H., Radwan, H.H., Livermore, D.M., 2014b. Distribution of β -lactamases in carbapenem-non-susceptible *Acinetobacter baumannii* in Riyadh, Saudi Arabia. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2, 17–21. doi:10.1016/j.jgar.2013.08.004
- Alvarez-Buylla, A., Culebras, E., Picazo, J.J., 2012. Identification of *Acinetobacter* species: is Bruker biotyper MALDI-TOF mass spectrometry a good alternative to molecular techniques? *Infect. Genet. Evol.* 12, 345–349. doi:10.1016/j.meegid.2012.01.002
- Anstey, N.M., Currie, B.J., Hassell, M., Palmer, D., Dwyer, B., Seifert, H., 2002. Community-acquired bacteremic *Acinetobacter* pneumonia in tropical Australia is caused by diverse strains of *Acinetobacter baumannii*, with carriage in the throat in at-risk groups. *J. Clin. Microbiol.* 40, 685–686. doi:10.1128/JCM.40.2.685-686.2002
- Bakour, S., Touati, A., Sahli, F., Ameer, A.A., Haouchine, D., Rolain, J.M., 2013. Antibiotic resistance determinants of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Algeria. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 76, 529–531. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2013.04.009

- Bartual, S.G., Seifert, H., Hippler, C., Luzon, M.A., Wisplinghoff, H., Rodríguez-Valera, F., 2005. Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* 43, 4382–4390. doi:10.1128/JCM.43.9.4382-4390.2005
- Baumann, P., 1968. Isolation of *Acinetobacter* from soil and water. *J. Bacteriol.* 96, 39–42.
- Baumann, P., Doudoroff, M., Stanier, R.Y., 1968. A study of the Moraxella group. II. Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). *J. Bacteriol.* 95, 1520–1541.
- Beceiro, A., Llobet, E., Aranda, J., Bengoechea, J.A., Doumith, M., Hornsey, M., Dhanji, H., Chart, H., Bou, G., Livermore, D.M., Woodford, N., 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. doi:10.1128/AAC.00079-11
- Beijerinck, M., 1911. Pigments as oxidation products formed by bacteria. n. *Encrypt. Royal Akad Sciences. Amsterdam.* 19, 1092-1103
- Belmonte, O., Pailhoriès, H., Kempf, M., Gaultier, M.P., Lemarié, C., Ramont, C., Joly-Guillou, M.L., 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. doi:10.1016/j.vetmic.2014.01.042
- Ben Othman, A., Zribi, M., Masmoudi, A., Abdellatif, S., Ben Lakhel, S., 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.* 42, 415–422. doi:10.1590/S1517-83822011000200001
- Bergogne-Berezin, E., Towner, K.J., 1996. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin. Microbiol. Rev.* 9, 148–165.
- Berlau, J., Aucken, H.M., Houang, E., 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
- Berlau, J., Aucken, H., Malnick, H., 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
- Blears, M.J., De Grandis, S., Lee, H., Trevors, J.T., 1998. Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its applications. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 21, 99–114. doi:10.1038/sj.jim.2900537
- Bogaerts, P., Naas, T., El Garch, F., Cuzon, G., Deplano, A., Delaire, T., Huang, T.D., Lissou, B., Nordmann, P., Glupczynski, Y., 2010. GES extended-spectrum β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* isolates in Belgium. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 4872–4878. doi:10.1128/AAC.00871-10

- Bogaerts, P., Rezende de Castro, R., Roisin, S., Deplano, A., Huang, T.D., Hallin, M., Denis, O., Glupczynski, Y., 2012. Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in Belgium. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 1552–1553. doi:10.1093/jac/dks041
- Bonnin, R.A., Cuzon, G., Poirel, L., Nordmann, P., 2013a. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clone, France. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 822–823. doi:10.3201/eid1905.121618
- Bonnin, R.A., Nordmann, P., Poirel, L., 2013b. Screening and deciphering antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii* : a state of the art. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 11, 571–583. doi:10.1586/eri.13.38
- Bonnin, R.A., Nordmann, P., Potron, A., Lecuyer, H., Zahar, J.R., Poirel, L., 2011a. Carbapenem-hydrolyzing GES-type extended-spectrum β -Lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 349–354. doi:10.1128/AAC.00773-10
- Bonnin, R.A., Poirel, L., Naas, T., Pirs, M., Seme, K., Schrenzel, J., Nordmann, P., 2012. Dissemination of New Delhi metallo- β -lactamase-1-producing *Acinetobacter baumannii* in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, E362–365. doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03928.x
- Bonnin, R.A., Potron, A., Poirel, L., Lecuyer, H., Neri, R., Nordmann, P., 2011b. PER-7, an extended-spectrum beta-lactamase with increased activity toward broad-spectrum cephalosporins in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 2424–2427. doi:10.1128/AAC.01795-10
- Bonnin, R.A., Rotimi, V.O., Al Hubail, M., Gasiorowski, E., Al Sweih, N., Nordmann, P., Poirel, L., 2013c. Wide dissemination of GES-type carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* isolates in Kuwait. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 183–188. doi:10.1128/AAC.01384-12
- Boo, T.W., Walsh, F., 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. doi:10.1099/jmm.0.004911-0
- Bou, G., Martínez-Beltrán, J., 2000. Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 428–432. doi:10.1128/AAC.44.2.428-432.2000
- Bou, G., Oliver, A., Martínez-Beltrán, J., 2000. OXA-24, a Novel Class D β -Lactamase with Carbapenemase Activity in an *Acinetobacter baumannii* Clinical Strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 1556–1561. doi:10.1128/AAC.44.6.1556-1561.2000
- Boulanger, A., Naas, T., Fortineau, N., Figueiredo, S., Nordmann, P., 2012. NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* from Algeria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 2214–2215. doi:10.1128/AAC.05653-11
- Bouvet, P.J., Grimont, P.A., 1986. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of

- Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. Int. J. Syst. Bacteriol. 36, 228–240. doi:10.1099/00207713-36-2-228
- Bouvet, P.J., Grimont, P.A., 1987. Identification and biotyping of clinical isolates of *Acinetobacter*. Ann. Inst. Pasteur Microbiol. 138, 569–578.
- Bouvet, P.J., Jeanjean, S., 1989. Delineation of new proteolytic genomic species in the genus *Acinetobacter*. Res. Microbiol. 140, 291–299.
- Bouvet, P.J., Joly-Guillou, M.L., 2000. *Acinetobacter*, in: Freney, J., Renaud, F., Hansen, W., Bollet, C. (Eds.), Précis de Bactériologie Clinique. ESKA - Alexandre Lacassagne, Paris, FR, pp. 1239–1258.
- Bouvresse, S., Socolovshi, C., Berdjane, Z., Durand, R., Izri, A., Raoult, D., Chosidow, O., 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. doi:10.1016/j.cimid.2011.08.007
- Brisou, J., Prévot, A.R., 1954. Etudes de la systématique bactérienne X. Révision des espèces réunies dans le genre *Achromobacter*. Ann. Inst. Past. 86, 722–728.
- Brown, S., Young, H.K., Amyes, S.G., 2005. Characterisation of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina. Clin. Microbiol. Infect. 11, 15–23. doi:10.1111/j.1469-0691.2004.01016.x
- Byrne-Bailey, K.G., Gaze, W.H., Kay, P., Boxall, A.B., Hawkey, P.M., Wellington, E.M., 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. doi:10.1128/AAC.00652-07
- Cai, Y., Chai, D., Wang, R., Liang, B., Bai, N., 2012. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. J. Antimicrob. Chemother. 67, 1607–1615. doi:10.1093/jac/dks084
- Catel-Ferreira, M., Coadou, G., Molle, V., Mugnier, P., Nordmann, P., Siroy, A., Jouenne, T., Dé, E., 2011. Structure-function relationships of CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*. J. Antimicrob. Chemother. 66, 2053–2056. doi:10.1093/jac/dkr267
- Cayô, R., Rodríguez, M.C., Espinal, P., Fernández-Cuenca, F., Ocampo-Sosa, A.A., Pascual, A., Ayala, J.A., Vila, J., Martínez-Martínez, L., 2011. Analysis of genes encoding penicillin-binding proteins in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 55, 5907–5913. doi:10.1128/AAC.00459-11
- Chang, H.C., Wei, Y.F., Dijkshoorn, L., Vaneechoutte, M., Tang, C.T., 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. doi:10.1128/JCM.43.4.1632-1639.2005

- Chang, K.M., Huang, W.C., Chiou, C.S., Shen, G.H., Huang, C.C., Wen, F.S., 2013. Suitable restriction enzyme for standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocol and interlaboratory comparison of *Acinetobacter baumannii*. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 46, 195–201. doi:10.1016/j.jmii.2012.05.011
- Chen, M.Z., Hsueh, P.R., Lee, L.N., Yu, C.J., Yang, P.C., Luh, K.T., 2001. Severe community-acquired pneumonia due to *Acinetobacter baumannii*. *Chest.* 120, 1072–1077. doi:10.1378/chest.120.4.1072
- Chen, T.L., Lee, Y.T., Kuo, S.C., Hsueh, P.R., Chang, F.Y., Siu, L.K., Ko, W.C., Fung, C.P., 2010. Emergence and distribution of plasmids bearing the *bla*_{OXA-51-like} gene with an upstream IS*AbaI* in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in Taiwan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 4575–4581. doi:10.1128/AAC.00764-10
- Chen, T.L., Siu, L.K., Wu, R.C., Shaio, M.F., Huang, L.Y., Fung, C.P., Lee, C.M., 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.* 13, 801–806. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01744.x
- Chen, Y., Zhou, Z., Jiang, Y., Yu, Y., 2011. Emergence of NDM-1-Producing *Acinetobacter baumannii* in China. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 1255–1259. doi:10.1093/jac/dkr082
- Chiang, M.C., Kuo, S.C., Chen, Y.C., Lee, Y.T., Chen, T.L., 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.* 44, 106–110. doi:10.1016/j.jmii.2010.04.003
- Choi, A.H., Slanti, L., Avci, F.Y., Pier, G.B., 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. doi:10.1128/JB.00647-09
- Choi, C.H., Hyun, S.H., Lee, J.Y., Lee, J.S., Lee, Y.S., Kim, S.A., Chae, J.P., Yoo, S.M., Lee, J.C., 2008a. *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A targets the nucleus and induces cytotoxicity. *Cell. Microbiol.* 10, 309–319. doi:10.1111/j.1462-5822.2007.01041.x
- Choi, C.H., Lee, E.Y., Lee, Y.C., Park, T.I., Kim, H.J., Hyun, S.H., Kim, S.A., Lee, S.K., 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. doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00538.x
- Choi, C.H., Lee, J.S., Lee, Y.C., Park, T.I., Lee, J.C., 2008b. *Acinetobacter baumannii* invades epithelial cells and outer membrane protein A mediates interactions with epithelial cells. *BMC Microbiol.* 8, 216. doi:10.1186/1471-2180-8-216
- Choi, J.Y., Kim, Y., Ko, E.A., Park, Y.K., Jheong, W.H., Ko, G., 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. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2012.06.023
- Chu, Y.W., Leung, C.M., Houang, E.T., Ng, K.C., Leung, C.B., Leung, H.Y., Cheng, A.F., 1999. Skin carriage of acinetobacters in Hong Kong. *J. Clin. Microbiol.* 37, 2962–2967.
- Cisneros, J.M., Rodríguez-Baño, J., 2002. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment. *Clin. Microbiol. Infect.* 8, 687–693.
- Coelho, J., Woodford, N., Afzal-Shah, M., Livermore, D., 2006. Occurrence of OXA-58-Like Carbapenemases in *Acinetobacter* spp. Collected over 10 Years in Three Continents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 756–758. doi:10.1128/AAC.50.2.756-758.2006
- Coelho-Souza, T., Reis, J.N., Martins, N., Martins, I.S., Menezes, A.O., Reis, M.G., Silva, N.O., Dias, R.C., Riley, L.W., Moreira, B.M., 2013. Longitudinal surveillance for meningitis by *Acinetobacter* in a large urban setting in Brazil. *Clin. Microbiol. Infect.* 19, E241–E244. doi:10.1111/1469-0691.12145
- Cordes, L.G., Brink, E.W., Checko, P.J., Lentnek, A., Lyons, R.W., Hayes, P.S., Wu, T.C., Tharr, D.G., Fraser, D.W., 1981. A cluster of *Acinetobacter* Pneumonia in foundry workers. *Ann. Intern. Med.* 95, 688–693. doi:10.7326/0003-4819-95-6-688
- Coyne, S., Courvalin, P., Périchon, B., 2011. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 947–953. doi:10.1128/AAC.01388-10
- D’Andrea, M.M., Giani, T., D’Arezzo, S., Capone, A., Petrosillo, N., Visca, P., Luzzaro, F., Rossolini, G.M., 2009. Characterization of pABVA01, a Plasmid Encoding the OXA-24 Carbapenemase from Italian Isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 3528–3533. doi:10.1128/AAC.00178-09
- D’Costa, V.M., King, C.E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W.W., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., Golding, G.B., Poinar, H.N., Wright, G.D., 2011. Antibiotic resistance is ancient. *Nature.* 477, 457–461. doi:10.1038/nature10388
- Decousser, J.W., Jansen, C., Nordmann, P., Emirian, A., Bonnin, R.A., Anais, L., Merle, J.C., Poirel, L., 2013. Outbreak of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in France, January to May 2013. *Euro Surveill.* 18, 20547.
- Decré, D., 2012. *Acinetobacter baumannii* et résistance aux antibiotiques: un modèle d’adaptation. *Rev. Francoph. Lab.* 42, 43–52. doi:RFL-04-2012-42-441-1773-035X-101019-201201289
- Di Popolo, A., Giannouli, M., Triassi, M., Brisse, S., 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.* 17, 197–201. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03254.x

- Diancourt, L., Passet, V., Nemeč, A., Dijkshoorn, L., Brisse, S., 2010. The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. PLoS ONE 5, e10034. doi:10.1371/journal.pone.0010034
- Dijkshoorn, L., Aucken, H., Gerner-Smidt, P., Janssen, P., Kaufmann, M.E., Garaizar, J., Ursing, J., Pitt, T.L., 1996. Comparison of outbreak and nonoutbreak *Acinetobacter baumannii* strains by genotypic and phenotypic methods. J. Clin. Microbiol. 34, 1519–25.
- Dijkshoorn, L., Nemeč, A., 2008. The diversity of the genus *Acinetobacter*, in: Gerischer, U. (Ed.), *Acinetobacter* molecular microbiology. Caister Academic Press, Norfolk, UK, pp. 1–34.
- Dijkshoorn, L., Nemeč, A., Seifert, H., 2007. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Nat. Rev. Microbiol. 5, 939–951. doi:10.1038/nrmicro1789
- Dijkshoorn, L., Tjernberg, I., Pot, B., Michel, M., Ursing, J., Kersters, K., 1990. Numerical analysis of cell envelope protein profiles of *Acinetobacter* strains classified by DNA-DNA hybridization. Syst. Appl. Microbiol. 13, 338–344. doi:10.1016/S0723-2020(11)80230-4
- Dijkshoorn, L., van Aken, E., Shunburne, L., van der Reijden, T.J., Bernardis, A.T., Nemeč, A., Towner, K.J., 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
- Dolzani, L., Tonin, E., Lagatolla, C., Prandin, L., Monti-Bragadin, C., 1995. Identification of *Acinetobacter* isolates in the *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex by restriction analysis of the 16S-23S rRNA intergenic-spacer sequences. J. Clin. Microbiol. 33, 1108–1113.
- Dortet, L., Poirel, L., Nordmann, P., 2014. Worldwide dissemination of the NDM-type carbapenemases in Gram-negative bacteria. BioMed Res. Int. 2014. Article ID 249856. doi:10.1155/2014/249856
- Dos Santos Saalfeld, S.M., Fukita Viana, G., Dias Siqueira, V.L., Cardoso, C.L., Botelho Garcia, L., Bronharo Tognim, M.C., 2009. Endemic carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a Brazilian intensive care unit. J. Hosp. Infect. 72, 365–368. doi:10.1016/j.jhin.2009.04.004
- Doughari, H.J., Ndakidemi, P.A., Human, I.S., Benade, S., 2011. The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: An overview. Microbes Environ. 26, 101–112. doi:10.1264/jsme2.ME10179
- Durmaz, R., Otlu, B., Koksall, F., Hosoglu, S., Ozturk, R., Ersoy, Y., Aktas, E., Gursoy, N.C., Caliskan, A., 2009. The optimization of a rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for the typing of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. Jpn. J. Infect. Dis. 62, 372–377.

- Ecker, J.A., Massire, C., Hall, T.A., Ranken, R., Pennella, T.T., Agasino Ivy, C., Blyn, L.B., Hofstadler, S.A., Endy, T.P., Scott, P.T., Lindler, L., Hamilton, T., Gaddy, C., Snow, K., Pe, M., Fishbain, J., Craft, D., Deye, G., Riddell, S., Milstrey, E., Petruccelli, B., Brisse, S., Harpin, V., Schink, A., Ecker, D.J., Sampath, R., Eshoo, M.W., 2006. Identification of *Acinetobacter* species and genotyping of *Acinetobacter baumannii* by multilocus PCR and mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 44, 2921–2932. doi:10.1128/JCM.00619-06
- Ehrenstein, B., Bernards, A.T., Dijkshoorn, L., Gerner-Smidt, P., Towner, K.J., Bouvet, P.J., Daschner, F.D., Grundmann, H., 1996. *Acinetobacter* species identification by using tRNA spacer fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* 34, 2414–2420.
- Endimiani, A., Hujer, K.M., Hujer, A.M., Bertschy, I., Rossano, A., Koch, C., Gerber, V., Francey, T., Bonomo, R.A., Perreten, V., 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
- Eraç, B., Hoşgör-Limoncu, M., Ermertcan, Ş., Taşlı, H., Aydemir, Ş., 2013. Prevalence of *bla*_{PER-1} and integrons in ceftazidime-resistant Gram-negative bacteria at a university hospital in Turkey. *Jpn. J. Infect. Dis.* 66, 146–148. doi:10.7883/yoken.66.146
- Erridge, C., Moncayo-Nieto, O.L., Morgan, R., Young, M., Poxton, I.R., 2007. *Acinetobacter baumannii* lipopolysaccharides are potent stimulators of human monocyte activation via Toll-like receptor 4 signalling. *J. Med. Microbiol.* 56, 165–171. doi:10.1099/jmm.0.46823-0
- Espinal, P., Poirel, L., Carmeli, Y., Kaase, M., Pal, T., Nordmann, P., Vila, J., 2013. Spread of NDM-2-producing *Acinetobacter baumannii* in the Middle East. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 1928–1930. doi:10.1093/jac/dkt109
- Espinal, P., Seifert, H., Dijkshoorn, L., Vila, J., Roca, I., 2012. Rapid and accurate identification of genomic species from the *Acinetobacter baumannii* (Ab) group by MALDI-TOF MS. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 1097–1103. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03696.x
- Euzéby, J., 2014. LPSN - List of Prokaryotic names with standing in nomenclature. URL: <http://www.bacterio.net/> (accessed 8.6.14).
- Evans, B.A., 2010. Significance of the OXA-51-like β -lactamases of *Acinetobacter baumannii*. University of Edinburgh. URL: <http://hdl.handle.net/1842/4481>
- Evans, B.A., Amyes, S.G., 2014. OXA β -Lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* 27, 241–263. doi:10.1128/CMR.00117-13
- Evans, B.A., Hamouda, A., Amyes, S.G., 2013. The rise of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Curr. Pharm. Des.* 19, 223–238. doi:10.2174/1381612811306020223
- Eveillard, M., Joly-Guillou, M.L., 2012. Infections émergentes à *Acinetobacter baumannii* et circonstances favorisant leur survenue. *Pathol. Biol.* 60, 314–319. doi:10.1016/j.patbio.2011.08.002

- Eveillard, M., Kempf, M., Belmonte, O., Pailhoriès, H., 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.* 17, e802–e805. doi:10.1016/j.ijid.2013.03.021
- Falagas, M.E., Bliziotis, I.A., Siempos, I.I., 2006. Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii* infections in critically ill patients: a systematic review of matched cohort and case-control studies. *Crit. Care.* 10, R48. doi:10.1186/cc4869
- Falagas, M.E., Karveli, E.A., Kelesidis, I., Kelesidis, T., 2007. Community-acquired *Acinetobacter* infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 26, 857–868. doi:10.1007/s10096-007-0365-6
- Farajnia, S., Azhari, F., Alikhani, M.Y., Hosseini, M.K., Peymani, A., Sohrabi, N., 2013. Prevalence of PER and VEB type extended spectrum betalactamases among multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in North-West of Iran. *Iran. J. Basic Med. Sci.* 16, 751–755.
- Fernández-Cuenca, F., Martínez-Martínez, L., Conejo, M.C., Ayala, J.A., Perea, E.J., Pascual, A., 2003. Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 51, 565–574. doi:10.1093/jac/dkg097
- Fournier, P.E., Vallenet, D., Barbe, V., Audic, S., Ogata, H., Poirel, L., Richet, H., Robert, C., Mangenot, S., Abergel, C., Nordmann, P., Weissenbach, J., Raoult, D., Claverie, J.-M., 2006. Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Genet.* 2, e7. doi:10.1371/journal.pgen.0020007
- Fu, Y., Zhou, J., Zhou, H., Yang, Q., Wei, Z., Yu, Y., 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. doi:10.1093/jac/dkq027
- Gaddy, J.A., Actis, L.A., 2009. Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Future Microbiol.* 4, 273–278. doi:10.2217/fmb.09.5
- Gaddy, J.A., Arivett, B.A., McConnell, M.J., López-Rojas, R., Pachón, J., 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. doi:10.1128/IAI.06279-11
- Gaddy, J.A., Tomaras, A.P., Actis, L.A., 2009. The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells. *Infect. Immun.* 77, 3150–3160. doi:10.1128/IAI.00096-09
- Gaynes, R., Edwards, J.R., National Nosocomial Infections Surveillance System, 2005. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clin. Infect. Dis.* 41, 848–854. doi:10.1086/432803

- Geiger, A., Fardeau, M.L., Grebaut, P., Vatunga, G., Josénando, T., Herder, S., Cuny, G., Truc, P., Ollivier, B., 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
- Gerner-Smidt, P., 1992. Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *J. Clin. Microbiol.* 30, 2680–2685.
- Gerner-Smidt, P., Tjernberg, I., Ursing, J., 1991. Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. *J. Clin. Microbiol.* 29, 277–282.
- Giannouli, M., Cuccurullo, S., Crivaro, V., Di Popolo, A., Bernardo, M., Tomasone, F., Amato, G., Brisse, S., Triassi, M., Utili, R., Zarrilli, R., 2010. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care hospital in Naples, Italy, shows the emergence of a novel epidemic clone. *J. Clin. Microbiol.* 48, 1223–1230. doi:10.1128/JCM.02263-09
- Giannouli, M., Tomasone, F., Agodi, A., Vahaboglu, H., Daoud, Z., Triassi, M., Tsakris, A., Zarrilli, R., 2009. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in intensive care units of multiple Mediterranean hospitals. *J. Antimicrob. Chemother.* 63, 828–830. doi:10.1093/jac/dkp032
- Gogou, V., Pournaras, S., Giannouli, M., Voulgari, E., Piperaki, E.T., Zarrilli, R., 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. doi:10.1093/jac/dkr390
- Gootz, T.D., Marra, A., 2008. *Acinetobacter baumannii*: an emerging multidrug-resistant threat. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 6, 309–325. doi:10.1586/14787210.6.3.309
- Gordon, N.C., Wareham, D.W., 2010. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 35, 219–226. doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.10.024
- Göttig, S., Pfeifer, Y., Wichelhaus, T.A., Zacharowski, K., Bingold, T., Averhoff, B., Brandt, C., Kempf, V.A., 2010. Global spread of New Delhi metallo- β -lactamase 1. *Lancet Infect. Dis.* 10, 828–829. doi:10.1016/S1473-3099(10)70275-9
- Gouveia, C., Asensi, M.D., Zahner, V., Rangel, E.F., Oliveira, S.M., 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
- Grisold, A.J., Zarfel, G., Strenger, V., Feierl, G., Leitner, E., Masoud, L., Hoenigl, M., Raggam, R.B., Dosch, V., Marth, E., 2010. Use of automated repetitive-sequence-based PCR for rapid laboratory confirmation of nosocomial outbreaks. *J. Infect.* 60, 44–51. doi:10.1016/j.jinf.2009.10.045

- Grosso, F., Carvalho, K.R., Quinteira, S., Ramos, A., Carvalho-Assef, A.P., Asensi, M.D., Peixe, L., 2011a. OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii*: a new hotspot of diversity in Rio De Janeiro? J. Antimicrob. Chemother. 66, 62–65. doi:10.1093/jac/dkq406
- Grosso, F., Quinteira, S., Peixe, L., 2011b. Understanding the dynamics of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* lineages within Portugal. Clin. Microbiol. Infect. 17, 1275–1279. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03469.x
- Gundi, V.A., Dijkshoorn, L., Burignat, S., Raoult, D., 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. doi:10.1099/mic.0.026054-0
- Gurung, M., Nam, H.M., Tamang, M.D., Chae, M.H., Jang, G.C., Jung, S.C., Lim, S.K., 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
- Hamidian, M., Hall, R.M., 2013. IS*Abal* targets a specific position upstream of the intrinsic *ampC* gene of *Acinetobacter baumannii* leading to cephalosporin resistance. J. Antimicrob. Chemother. 68, 2682–2683. doi:10.1093/jac/dkt233
- Hamouche, E., Sarkis, D.K., 2012. Évolution de la sensibilité aux antibiotiques de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* dans un CHU de Beyrouth entre 2005 et 2009. Pathol. Biol. 60, e15–20. doi:10.1016/j.patbio.2011.03.011
- Hamouda, A., Evans, B.A., Towner, K.J., Amyes, S.G., 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. doi:10.1128/JCM.02431-09
- Hamouda, A., Findlay, J., Al Hassan, L., 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
- Hamzeh, A.R., Al Najjar, M., Mahfoud, M., 2012. Prevalence of antibiotic resistance among *Acinetobacter baumannii* isolates from Aleppo, Syria. Am. J. Infect. Control. 40, 776–777. doi:10.1016/j.ajic.2011.09.019
- Harakeh, S., Yassine, H., El-Fadel, M., 2006. Antimicrobial-resistant patterns of *Escherichia coli* and *Salmonella* strains in the aquatic Lebanese environments. Environ. Pollut. 143, 269–277. doi:10.1016/j.envpol.2005.11.027
- Hasan, B., Perveen, K., Olsen, B., Zahra, R., 2014. Emergence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in hospitals in Pakistan. J. Med. Microbiol. 63, 50–55. doi:10.1099/jmm.0.063925-0

- Héritier, C., Poirel, L., Fournier, P.E., Claverie, J.M., Raoult, D., Nordmann, P., 2005a. Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 4174–4179. doi:10.1128/AAC.49.10.4174-4179.2005
- Héritier, C., Poirel, L., Lambert, T., Nordmann, P., 2005b. Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 3198–3202. doi:10.1128/AAC.49.8.3198-3202.2005
- Héritier, C., Poirel, L., Nordmann, P., 2006. Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of IS*AbaI* in *Acinetobacter baumannii*. *Clin. Microbiol. Infect.* 12, 123–130. doi:10.1111/j.1469-0691.2005.01320.x
- Higgins, P.G., Dammhayn, C., Hackel, M., Seifert, H., 2010a. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 233–238. doi:10.1093/jac/dkp428
- Higgins, P.G., Janssen, K., Fresen, M.M., Wisplinghoff, H., 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. doi:10.1128/JCM.01759-12
- Higgins, P.G., Lehmann, M., Wisplinghoff, H., Seifert, H., 2010b. *gyrB* multiplex PCR to differentiate between *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter* genomic species 3. *J. Clin. Microbiol.* 48, 4592–4594. doi:10.1128/JCM.01765-10
- Higgins, P.G., Pérez-Llarena, F.J., Zander, E., Fernández, A., Bou, G., 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. doi:10.1128/AAC.02413-12
- Higgins, P.G., Poirel, L., Lehmann, M., Nordmann, P., Seifert, H., 2009. OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D β -Lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 5035–5038. doi:10.1128/AAC.00856-09
- Higgins, P.G., Wisplinghoff, H., Krut, O., Seifert, H., 2007. A PCR-based method to differentiate between *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomic species 13TU. *Clin. Microbiol. Infect.* 13, 1199–1201. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01819.x
- Hojabri, Z., Pajand, O., Bonura, C., Aleo, A., Giammanco, A., Mammina, C., 2014. Molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* in Iran: endemic and epidemic spread of multiresistant isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* doi:10.1093/jac/dku045
- Houang, E.T., Chu, Y.W., Leung, C.M., Chu, K.Y., Berlau, J., Ng, K.C., Cheng, A.F., 2001. Epidemiology and infection control implications of *Acinetobacter* spp. in Hong Kong. *J. Clin. Microbiol.* 39, 228–234. doi:10.1128/JCM.39.1.228-234.2001
- Howard, A., O'Donoghue, M., Feeney, A., Sleator, R.D., 2012. *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. *Virulence.* 3, 243–250. doi:10.4161/viru.19700

- Hrabák, J., Stolbová, M., Studentová, V., Fridrichová, M., Chudáčková, E., Zemlickova, H., 2012. NDM-1 producing *Acinetobacter baumannii* isolated from a patient repatriated to the Czech Republic from Egypt, July 2011. *Euro Surveill.* 17, 20085.
- Hrenovic, J., Durn, G., Goic-Barisic, I., Kovacic, A., 2014. Occurrence of an environmental *Acinetobacter baumannii* strain similar to a clinical isolate in paleosol from Croatia. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 2860–2866. doi:10.1128/AEM.00312-14
- Hsueh, P.R., Teng, L.J., Chen, C.Y., Chen, W.H., Yu, C.J., Ho, S.W., Luh, K.T., 2002. Pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* causing nosocomial infections in a university hospital, Taiwan. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 827–832. doi:10.3201/eid0805.020014
- Huys, G., Bartie, K., Cnockaert, M., Hoang Oanh, D.T., Phuong, N.T., Somsiri, T., Chinabut, S., Yusoff, F.M., Shariff, M., Giacomini, M., Teale, A., Swings, J., 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
- Ibrahim, A., Gerner-Smidt, P., Liesack, W., 1997. Phylogenetic relationship of the twenty-one DNA groups of the genus *Acinetobacter* as revealed by 16S ribosomal DNA sequence analysis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 837–841. doi:10.1099/00207713-47-3-837
- Izdebski, R., Fielt, J., Hryniewicz, W., Gniadkowski, M., 2012. Molecular analysis of *Acinetobacter baumannii* isolates from invasive infections in 2009 in Poland. *J. Clin. Microbiol.* 50, 3813–3815. doi:10.1128/JCM.02271-12
- Jacobs, A.C., Hood, I., Boyd, K.L., Olson, P.D., Morrison, J.M., Carson, S., Sayood, K., Iwen, P.C., Skaar, E.P., Dunman, P.M., 2010. Inactivation of phospholipase D diminishes *Acinetobacter baumannii* pathogenesis. *Infect. Immun.* 78, 1952–1962. doi:10.1128/IAI.00889-09
- Janda, J.M., 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. doi:10.1128/JCM.01228-07
- Janssen, P., Maquelin, K., Coopman, R., Tjernberg, I., Bouvet, P., Kersters, K., Dijkshoorn, L., 1997. Discrimination of *Acinetobacter* genomic species by AFLP fingerprinting. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 1179–1187.
- Jawad, A., Hawkey, P.M., Heritage, J., 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.
- Jawad, A., Seifert, H., Snelling, A.M., Heritage, J., Hawkey, P.M., 1998. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. *J. Clin. Microbiol.* 36, 1938–1941.

- Ji, S., Chen, Y., Ruan, Z., Fu, Y., Ji, J., Fu, Y., Wang, H., Yu, Y., 2014. Prevalence of carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase genes in *Acinetobacter* spp. isolates in China. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 33, 989–997. doi:10.1007/s10096-013-2037-z
- Jin, J.S., Kwon, S.O., Moon, D.C., Gurung, M., Lee, J.H., Kim, S.I., Lee, J.C., 2011. *Acinetobacter baumannii* secretes cytotoxic outer membrane protein A via outer membrane vesicles. *PloS One.* 6, e17027. doi:10.1371/journal.pone.0017027
- Johnson, E.N., Burns, T.C., Hayda, R.A., Hospenthal, D.R., Murray, C.K., 2007. Infectious complications of open type III tibial fractures among combat casualties. *Clin. Infect. Dis.* 45, 409–415. doi:10.1086/520029
- Joly-Guillou, M.L., 2005. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. *Clin. Microbiol. Infect.* 11, 868–873. doi:10.1111/j.1469-0691.2005.01227.x
- Kaase, M., Nordmann, P., Wichelhaus, T.A., Gatermann, S.G., Bonnin, R.A., Poirel, L., 2011. NDM-2 carbapenemase in *Acinetobacter baumannii* from Egypt. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 1260–1262. doi:10.1093/jac/dkr135
- Kamolvit, W., Higgins, P.G., Paterson, D.L., Seifert, H., 2014. Multiplex PCR to detect the genes encoding naturally occurring oxacillinases in *Acinetobacter* spp. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 959–963. doi:10.1093/jac/dkt480
- Karah, N., Giske, C.G., Sundsfjord, A., Samuelsen, Ø., 2011a. 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.* 17, 545–549. doi:10.1089/mdr.2011.0089
- Karah, N., Haldorsen, B., Hegstad, K., Simonsen, G.S., Sundsfjord, A., Samuelsen, Ø., Norwegian Study Group of *Acinetobacter*, 2011b. Species identification and molecular characterization of *Acinetobacter* spp. blood culture isolates from Norway. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 738–744. doi:10.1093/jac/dkq521
- Karah, N., Sundsfjord, A., Towner, K., Samuelsen, Ø., 2012. Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii*. *Drug Resist. Updat.* 15, 237–247. doi:10.1016/j.drup.2012.06.001
- Karthikeyan, K., Thirunarayan, M.A., Krishnan, P., 2010. Coexistence of *bla*_{OXA-23} with *bla*_{NDM-1} and *armA* in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from India. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 2253–2254. doi:10.1093/jac/dkq273
- Kempf, M., Abdissa, A., Diatta, G., Trape, J.F., Angelakis, E., Mediannikov, O., La Scola, B., Raoult, D., 2012a. Detection of *Acinetobacter baumannii* in human head and body lice from Ethiopia and identification of new genotypes. *Int. J. Infect. Dis.* 16, e680–683. doi:10.1016/j.ijid.2012.05.1024

- Kempf, M., 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. doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.10.004
- Kempf, M., Rolain, J.M., Diatta, G., Azza, S., Samb, B., Mediannikov, O., Gassama Sow, A., Diene, S.M., Fenollar, F., Raoult, D., 2012b. 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
- Kiani, Q.H., Amir, M., Ghazanfar, M.A., Iqbal, M., 2009. Microbiology of wound infections among hospitalised patients following the 2005 Pakistan earthquake. *J. Hosp. Infect.* 73, 71–78. doi:10.1016/j.jhin.2009.06.012
- Kim, C.K., Lee, Y., Lee, H., Woo, G.J., Song, W., Kim, M.N., Lee, W.G., Jeong, S.H., Lee, K., 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. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2010.07.014
- Kishii, K., Kikuchi, K., Matsuda, N., Yoshida, A., Okuzumi, K., Uetera, Y., Yasuhara, H., Moriya, K., 2013. 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.* 20, 424–430. doi:10.1111/1469-0691.12376
- Knapp, S., Wieland, C.W., Florquin, S., Pantophlet, R., Dijkshoorn, L., Tshimbalanga, N., Akira, S., van der Poll, T., 2006. Differential roles of CD14 and toll-like receptors 4 and 2 in murine *Acinetobacter* pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 173, 122–129. doi:10.1164/rccm.200505-730OC
- Ko, W.C., Lee, N.Y., Su, S.C., Dijkshoorn, L., Vanechoutte, M., Wang, L.R., Yan, J.J., Chang, T.C., 2008. Oligonucleotide array-based identification of species in the *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* complex in isolates from blood cultures and antimicrobial susceptibility testing of the isolates. *J. Clin. Microbiol.* 46, 2052–2059. doi:10.1128/JCM.00014-08
- Koeleman, J.G., Stoof, J., Biesmans, D.J., Savelkoul, P.H., Vandenbroucke-Grauls, C.M., 1998. Comparison of amplified ribosomal DNA restriction analysis, random amplified polymorphic DNA analysis, and amplified fragment length polymorphism fingerprinting for identification of *Acinetobacter* genomic species and typing of *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* 36, 2522–2529.
- Kohlenberg, A., Brümmer, S., Higgins, P.G., Sohr, D., Piening, B.C., De Grahl, C., Halle, E., Rüdén, H., Seifert, H., 2009. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the carbapenemase OXA-23 in a German university medical centre. *J. Med. Microbiol.* 58, 1499–1507. doi:10.1099/jmm.0.012302-0

- Krawczyk, B., Lewandowski, K., Kur, J., 2002. Comparative studies of the *Acinetobacter* genus and the species identification method based on the *recA* sequences. *Mol. Cell. Probes* 16, 1–11. doi:10.1006/mcpr.2001.0388
- Krizova, L., Bonnin, R.A., Nordmann, P., Nemeč, A., Poirel, L., 2012. Characterization of a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain carrying the *bla*_{NDM-1} and *bla*_{OXA-23} carbapenemase genes from the Czech Republic. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 1550–1552. doi:10.1093/jac/dks064
- Krizova, L., Poirel, L., Nordmann, P., Nemeč, A., 2013. TEM-1 β -lactamase as a source of resistance to sulbactam in clinical strains of *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 2786–2791. doi:10.1093/jac/dkt275
- Kwon, S.O., Gho, Y.S., Lee, J.C., Kim, S.I., 2009. Proteome analysis of outer membrane vesicles from a clinical *Acinetobacter baumannii* isolate. *FEMS Microbiol. Lett.* 297, 150–156. doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01669.x
- La Scola, B., Gundi, V.A., Khamis, A., Raoult, D., 2006. Sequencing of the *rpoB* gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter* species. *J. Clin. Microbiol.* 44, 827–832. doi:10.1128/JCM.44.3.827-832.2006
- La Scola, B., Raoult, D., 2004. *Acinetobacter baumannii* in human body louse. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 1671–1673. doi:10.3201/eid1009.040242
- Lagatolla, C., Lavenia, A., Tonin, E., Monti-Bragadin, C., Dolzani, L., 1998. Characterization of oligonucleotide probes for the identification of *Acinetobacter* spp., *A. baumannii* and *Acinetobacter* genomic species 3. *Res. Microbiol.* 149, 557–566. doi:10.1016/S0923-2508(99)80003-5
- Lee, H.W., Koh, Y.M., Kim, J., Lee, J.C., Lee, Y.C., Seol, S.Y., Cho, D.T., Kim, J., 2008. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. *Clin. Microbiol. Infect.* 14, 49–54. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01842.x
- 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., Kang, S.H., Moon, D.S., 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. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2013.07.013
- 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., Yong, D., Jeong, S.H., Lee, K., Chong, Y., 2013. Increasing prevalence of *bla*_{OXA-23}-carrying *Acinetobacter baumannii* and the emergence of *bla*_{OXA-182}-carrying *Acinetobacter nosocomialis* in Korea. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 77, 160–163. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2013.06.009

- Lee, Y., Yum, J.H., Kim, C.K., Yong, D., Jeon, E.H., Jeong, S.H., Ahn, J.Y., Lee, K., 2010. Role of OXA-23 and AdeABC efflux pump for acquiring carbapenem resistance in an *Acinetobacter baumannii* strain carrying the *bla*_{OXA-66} gene. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 40, 43–48.
- Lee, Y.T., Kuo, S.C., Chiang, M.C., Yang, S.P., Chen, C.P., Chen, T.L., Fung, C.P., 2012. Emergence of carbapenem-resistant non-*baumannii* species of *Acinetobacter* harboring a *bla*_{OXA-51-Like} gene that is intrinsic to *A. baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 1124–1127. doi:10.1128/AAC.00622-11
- Lee, Y.T., Turton, J.F., Chen, T.L., Wu, R.C., Chang, W.C., Fung, C.P., Chen, C.P., Cho, W.L., Huang, L.Y., Siu, L.K., 2009. First identification of *bla*_{OXA-51-like} in non-*baumannii* *Acinetobacter* spp. *J. Chemother.* 21, 514–520.
- Leung, W.S., Chu, C.M., Tsang, K.Y., Lo, F.H., Lo, K.F., Ho, P.L., 2006. Fulminant community-acquired *Acinetobacter baumannii* pneumonia as a distinct clinical syndrome. *Chest.* 129, 102–109. doi:10.1378/chest.129.1.102
- Li, W., Raoult, D., Fournier, P.E., 2009. Bacterial strain typing in the genomic era. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 892–916. doi:10.1111/j.1574-6976.2009.00182.x
- Loehfelm, T.W., Luke, N.R., Campagnari, A.A., 2008. Identification and characterization of an *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein. *J. Bacteriol.* 190, 1036–1044. doi:10.1128/JB.01416-07
- Lolans, K., Rice, T.W., Munoz-Price, L.S., Quinn, J.P., 2006. Multicity outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing the carbapenemase OXA-40. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 2941–2945. doi:10.1128/AAC.00116-06
- Lopez-Otsoa, F., Gallego, L., Towner, K.J., Tysall, L., Woodford, N., Livermore, D.M., 2002. Endemic carbapenem resistance associated with OXA-40 carbapenemase among *Acinetobacter baumannii* isolates from a hospital in Northern Spain. *J. Clin. Microbiol.* 40, 4741–4743. doi:10.1128/JCM.40.12.4741-4743.2002
- Lu, P.L., Doumith, M., Livermore, D.M., Chen, T.P., Woodford, N., 2009. Diversity of carbapenem resistance mechanisms in *Acinetobacter baumannii* from a Taiwan hospital: spread of plasmid-borne OXA-72 carbapenemase. *J. Antimicrob. Chemother.* 63, 641–647. doi:10.1093/jac/dkn553
- 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., Campagnari, A.A., 2010. Identification and characterization of a glycosyltransferase involved in *Acinetobacter baumannii* lipopolysaccharide core biosynthesis. *Infect. Immun.* 78, 2017–2023. doi:10.1128/IAI.00016-10
- Maâtallah, M., Bakhrouf, A., Habeeb, M.A., Turlej-Rogacka, A., Iversen, A., Pourcel, C., Sioud, O., Giske, C.G., 2013. Four genotyping schemes for phylogenetic analysis of

- Pseudomonas aeruginosa*: comparison of their congruence with multi-locus sequence typing. PLoS ONE. 8, e82069. doi:10.1371/journal.pone.0082069
- Manji, R., Bythrow, M., Branda, J.A., Burnham, C.A., Ferraro, M.J., Garner, O.B., Jennemann, R., Lewinski, M.A., Mochon, A.B., Procop, G.W., Richter, S.S., Rychert, J.A., Sercia, L., Westblade, L.F., Ginocchio, C.C., 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. 33, 337–346. doi:10.1007/s10096-013-1961-2
- Marchaim, D., Navon-Venezia, S., Schwartz, D., Tarabeia, J., Fefer, I., Schwaber, M.J., Carmeli, Y., 2007. Surveillance cultures and duration of carriage of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. J. Clin. Microbiol. 45, 1551–1555. doi:10.1128/JCM.02424-06
- Matar, G.M., Gay, E., Cooksey, R.C., Elliott, J.A., Heneine, W.M., Uwaydah, M.M., Matossian, R.M., Tenover, F.C., 1992. Identification of an epidemic strain of *Acinetobacter baumannii* using electrophoretic typing methods. Eur. J. Epidemiol. 8, 9–14.
- Matsui, M., Suzuki, S., Yamane, K., Suzuki, M., Konda, T., Arakawa, Y., Shibayama, K., 2014. Distribution of carbapenem resistance determinants among epidemic and non-epidemic types of *Acinetobacter* species in Japan. J. Med. Microbiol. 63, 870–877. doi:10.1099/jmm.0.069138-0
- McConnell, M.J., Actis, L., Pachón, J., 2013. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. FEMS Microbiol. Rev. 37, 130–155. doi:10.1111/j.1574-6976.2012.00344.x
- 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., Waterman, P.E., Lesho, E.P., 2013. Detection of New Delhi Metallo- β -Lactamase (Encoded by *bla*_{NDM-1}) in *Acinetobacter schindleri* during Routine Surveillance. J. Clin. Microbiol. 51, 1942–1944. doi:10.1128/JCM.00281-13
- Mencacci, A., Monari, C., Leli, C., Merlini, L., De Carolis, E., Vella, A., Cacioni, M., Buzi, S., Nardelli, E., Bistoni, F., Sanguinetti, M., Vecchiarelli, A., 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. doi:10.1128/JCM.01811-12
- Merino, M., Acosta, J., Poza, M., Sanz, F., Beceiro, A., Chaves, F., 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. doi:10.1128/AAC.01674-09
- Minandri, F., D'Arezzo, S., Antunes, L.C., Pourcel, C., Principe, L., Petrosillo, N., 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. doi:10.1128/JCM.05555-11

- Moffatt, J.H., Harper, M., Adler, B., Nation, R.L., Li, J., Boyce, J.D., 2011. Insertion sequence IS*Abal1* is involved in colistin resistance and loss of lipopolysaccharide in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 3022–3024. doi:10.1128/AAC.01732-10
- Moffatt, J.H., Harper, M., Harrison, P., Hale, J.D., Vinogradov, E., Seemann, T., Henry, R., Crane, B., St Michael, F., Cox, A.D., Adler, B., Nation, R.L., Li, J., Boyce, J.D., 2010. Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 4971–4977. doi:10.1128/AAC.00834-10
- Mortensen, B.L., 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. doi:10.3389/fcimb.2013.00095
- Mosqueda, N., Espinal, P., Cosgaya, C., Viota, S., Plasencia, V., Alvarez-Lerma, F., Montero, M., Gómez, J., Horcajada, J.P., Vila, J., Roca, I., 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. doi:10.1128/AAC.01486-13
- Mostachio, A.K., Levin, A.S., Rizek, C., Rossi, F., Zerbini, J., 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
- Mugnier, P.D., Poirel, L., Naas, T., Nordmann, P., 2010. Worldwide dissemination of the *bla*_{OXA-23} carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 35–40. doi:10.3201/eid1601.090852
- Munoz-Price, L.S., Weinstein, R.A., 2008. *Acinetobacter* infection. *N. Engl. J. Med.* 358, 1271–1281. doi:10.1056/NEJMra070741
- Mussi, M.A., Gaddy, J.A., Cabruja, M., Arivett, B.A., Viale, A.M., Rasia, R., Actis, L.A., 2010. The opportunistic human pathogen *Acinetobacter baumannii* senses and responds to light. *J. Bacteriol.* 192, 6336–6345. doi:10.1128/JB.00917-10
- Mussi, M.A., Limansky, A.S., 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 B-Barrel outer membrane proteins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 1432–1440. doi:10.1128/AAC.49.4.1432-1440.2005
- Naas, T., Bogaerts, P., Bauraing, C., Degheldre, Y., Glupczynski, Y., Nordmann, P., 2006a. Emergence of PER and VEB extended-spectrum beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii* in Belgium. *J. Antimicrob. Chemother.* 58, 178–182. doi:10.1093/jac/dkl178

- Naas, T., Coignard, B., Carbonne, A., Blanckaert, K., Bajolet, O., Bernet, C., Verdeil, X., Astagneau, P., Desenclos, J.C., Nordmann, P., French Nosocomial Infection Early Warning Investigation and Surveillance Network, 2006b. VEB-1 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii*, France. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 1214–1222. doi:10.3201/eid1208.051547
- Naas, T., Levy, M., Hirschauer, C., Marchandin, H., Nordmann, P., 2005. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-23 in a tertiary care hospital of Papeete, French Polynesia. *J. Clin. Microbiol.* 43, 4826–4829. doi:10.1128/JCM.43.9.4826-4829.2005
- Nakazawa, Y., Ii, R., Tamura, T., Hoshina, T., Tamura, K., Kawano, S., Kato, T., Sato, F., Horino, T., Yoshida, M., Hori, S., Sanui, M., Ishii, Y., Tateda, K., 2013. A case of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* transferred from India to Japan. *J. Infect. Chemother.* 19, 330–332. doi:10.1007/s10156-012-0469-5
- Nemec, A., 2014. Classification of the genus *Acinetobacter*. URL: <http://apps.szu.cz/anemec/anemec.htm> (accessed 17.05.2014).
- Nemec, A., Dijkshoorn, L., van der Reijden, T.J., 2004a. Long-term predominance of two pan-European clones among multi-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in the Czech Republic. *J. Med. Microbiol.* 53, 147–153. doi:10.1099/jmm.0.05445-0
- Nemec, A., Dolzani, L., Brisse, S., van den Broek, P., Dijkshoorn, L., 2004b. Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-European *Acinetobacter baumannii* clones. *J. Med. Microbiol.* 53, 1233–1240. doi:10.1099/jmm.0.45716-0
- Nemec, A., Krizova, L., Maixnerova, M., van der Reijden, T.J., Deschaght, P., Passet, V., Vaneechoutte, M., Brisse, S., 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. doi:10.1016/j.resmic.2011.02.006
- Nemec, A., Musílek, M., Sedo, O., De Baere, T., Maixnerová, M., van der Reijden, T.J., Zdráhal, Z., Vaneechoutte, M., Dijkshoorn, L., 2010. *Acinetobacter bereziniae* sp. nov. and *Acinetobacter guillouiae* sp. nov., to accommodate *Acinetobacter* genomic species 10 and 11, respectively. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 896–903. doi:10.1099/ijs.0.013656-0
- Nemec, A., Musílek, M., Vaneechoute, M., Falsen, E., 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. doi:10.1128/JCM.01003-08
- Niu, C., Clemmer, K.M., Bonomo, R.A., Rather, P.N., 2008. Isolation and characterization of an autoinducer synthase from *Acinetobacter baumannii*. *J. Bacteriol.* 190, 3386–3392. doi:10.1128/JB.01929-07

- O'Shea, M.K., 2012. *Acinetobacter* in modern warfare. Int. J. Antimicrob. Agents 39, 363–375. doi:10.1016/j.ijantimicag.2012.01.018
- Obuekwe, C.O., Al-Jadi, Z.K., 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
- Oncül, O., Keskin, O., Acar, H.V., Küçükardali, Y., Evrenkaya, R., Atasoyu, E.M., Top, C., Nalbant, S., Ozkan, S., Emekdaş, G., Cavuşlu, S., Us, M.H., Pahsa, A., Gökben, M., 2002. Hospital-acquired infections following the 1999 Marmara earthquake. J. Hosp. Infect. 51, 47–51. doi:10.1053/jhin.2002.1205
- Ong, C.W., Lye, D.C., Khoo, K.L., Chua, G.S., Yeoh, S.F., Leo, Y.S., Tambyah, P.A., Chua, A.C., 2009. Severe community-acquired *Acinetobacter baumannii* pneumonia: an emerging highly lethal infectious disease in the Asia-Pacific. Respirology. 14, 1200–1205. doi:10.1111/j.1440-1843.2009.01630.x
- Opazo, A., Sonnevend, A., Lopes, B., Hamouda, A., Ghazawi, A., Pal, T., 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. doi:10.1093/jac/dks087
- Park, S., Lee, K.M., Yoo, Y.S., Yoo, J.S., Yoo, J.I., Kim, H.S., Lee, Y.S., Chung, G.T., 2011. Alterations of *gyrA*, *gyrB*, and *parC* and activity of efflux pump in fluoroquinolone-resistant *Acinetobacter baumannii*. Osong Public Health Res. Perspect. 2, 164–170. doi:10.1016/j.phrp.2011.11.040
- Park, Y.K., Jung, S.I., Park, K.H., Cheong, H.S., Peck, K.R., Song, J.H., Ko, K.S., 2009. Independent emergence of colistin-resistant *Acinetobacter* spp. isolates from Korea. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 64, 43–51. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2009.01.012
- Pasteran, F., Mora, M.M., Albornoz, E., Faccione, D., Franco, R., Ortellado, J., Melgarejo, N., Gomez, S., Riquelme, I., Matheu, J., Ramon-Pardo, P., Corso, A., 2014. Emergence of genetically unrelated NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* strains in Paraguay. J. Antimicrob. Chemother. doi:10.1093/jac/dku139
- Patel, R., 2013. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry in Clinical Microbiology. Clin. Infect. Dis. 57, 564–572. doi:10.1093/cid/cit247
- Paton, R., Miles, R.S., Hood, J., Amyes, S.G., Miles, R.S., Amyes, S.G., 1993. ARI 1: beta-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. Int. J. Antimicrob. Agents. 2, 81–87. doi:10.1016/0924-8579(93)90045-7
- Peleg, A.Y., Seifert, H., Paterson, D.L., 2008. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. Clin. Microbiol. Rev. 21, 538–582. doi:10.1128/CMR.00058-07

- Petersen, K., Riddle, M.S., Danko, J.R., Blazes, D.L., Hayden, R., Tasker, S.A., Dunne, J.R., 2007. Trauma-related infections in battlefield casualties from Iraq. *Ann. Surg.* 245, 803–811. doi:10.1097/01.sla.0000251707.32332.c1
- Pfeifer, Y., Wilharm, G., Zander, E., Wichelhaus, T.A., Göttig, S., Hunfeld, K.P., Seifert, H., Witte, W., Higgins, P.G., 2011. Molecular characterization of *bla*_{NDM-1} in an *Acinetobacter baumannii* strain isolated in Germany in 2007. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 1998–2001. doi:10.1093/jac/dkr256
- Poirel, L., Berçot, B., Millemann, Y., Bonnin, R.A., Pannaux, G., Nordmann, P., 2012. Carbapenemase-producing *Acinetobacter* spp. in Cattle, France. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 523–525. doi:10.3201/eid1803.111330
- Poirel, L., Figueiredo, S., Cattoir, V., Carattoli, A., Nordmann, P., 2008. *Acinetobacter radioresistens* as a silent source of carbapenem resistance for *Acinetobacter* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 1252–1256. doi:10.1128/AAC.01304-07
- Poirel, L., Marqué, S., Héritier, C., Segonds, C., Chabanon, G., Nordmann, P., 2005. OXA-58, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 202–208. doi:10.1128/AAC.49.1.202-208.2005
- Poirel, L., Naas, T., Nordmann, P., 2010. Diversity, epidemiology, and genetics of class D β -Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 24–38. doi:10.1128/AAC.01512-08
- Poirel, L., Nordmann, P., 2006a. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.* 12, 826–836. doi:10.1111/j.1469-0691.2006.01456.x
- Poirel, L., Nordmann, P., 2006b. Genetic structures at the origin of acquisition and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene *bla*_{OXA-58} in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 1442–1448. doi:10.1128/AAC.50.4.1442-1448.2006
- Potron, A., Munoz-Price, L.S., Nordmann, P., Cleary, T., Poirel, L., 2011. Genetic features of CTX-M-15-producing *Acinetobacter baumannii* from Haiti. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 5946–5948. doi:10.1128/AAC.05124-11
- Pournaras, S., Gogou, V., Giannouli, M., Dimitroulia, E., Dafopoulou, K., Tsakris, A., Zarrilli, R., 2014. Single locus sequence-based typing of *bla*_{OXA-51-like} gene for rapid classification of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates to international clones. *J. Clin. Microbiol.* 52, 1653–1657. doi:10.1128/JCM.03565-13
- Principe, L., Piazza, A., Giani, T., Bracco, S., Caltagirone, M.S., Arena, F., Nucleo, E., Tammaro, F., Rossolini, G.M., Pagani, L., Luzzaro, F., AMCLI-CRAb Survey participants., 2014. Epidemic diffusion of OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* in Italy: results of the first cross-sectional countrywide survey. *J. Clin. Microbiol.* 52, 3004–3010. doi:10.1128/JCM.00291-14

- Rafei, R., Dabboussi, F., Hamze, M., Eveillard, M., Lemarié, C., Mallat, H., Rolain, J.M., Joly-Guillou, M.L., Kempf, M., 2014. First report of *bla*_{NDM-1}-producing *Acinetobacter baumannii* isolated in Lebanon from civilians wounded during the Syrian war. *Int. J. Infect. Dis.* 21, 21–23. doi:10.1016/j.ijid.2014.01.004
- Revathi, G., Siu, L.K., Lu, P.L., Huang, L.Y., 2013. First report of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in East Africa. *Int. J. Infect. Dis.* 17, e1255–1258. doi:10.1016/j.ijid.2013.07.016
- Robledo, I.E., Aquino, E.E., Santé, M.I., Santana, J.L., Otero, D.M., León, C.F., Vázquez, G.J., 2010. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 1354–1357. doi:10.1128/AAC.00899-09
- Roca, I., Espinal, P., Vila-Farrés, X., Vila, J., 2012. The *Acinetobacter baumannii* oxymoron: commensal hospital dweller turned pan-drug-resistant menace. *Front. Microbiol.* 3. doi:10.3389/fmicb.2012.00148
- Rodríguez-Martínez, J.M., Poirel, L., Nordmann, P., 2010. Genetic and functional variability of AmpC-type β -lactamases from *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 4930–4933. doi:10.1128/AAC.00427-10
- Rumbo, C., Fernández-Moreira, E., Merino, M., Poza, M., Mendez, J.A., Soares, N.C., Mosquera, A., Chaves, F., 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. doi:10.1128/AAC.00929-10
- Russo, T.A., Luke, N.R., Beanan, J.M., Olson, R., Sauberan, S.L., MacDonald, U., Schultz, L.W., Umland, T.C., Campagnari, A.A., 2010. The K1 capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* strain 307-0294 is a major virulence factor. *Infect. Immun.* 78, 3993–4000. doi:10.1128/IAI.00366-10
- Russo, T.A., MacDonald, U., Beanan, J.M., Olson, R., MacDonald, I.J., Sauberan, S.L., Luke, N.R., Schultz, L.W., Umland, T.C., 2009. Penicillin-binding protein 7/8 contributes to the survival of *Acinetobacter baumannii* *in vitro* and *in vivo*. *J. Infect. Dis.* 199, 513–521. doi:10.1086/596317
- Sader, H.S., Farrell, D.J., Flamm, R.K., Jones, R.N., 2014. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms isolated from patients hospitalized in intensive care units in United States and European hospitals (2009-2011). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 78, 443–448. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2013.11.025
- Saeed, S., Fakih, M.G., Riederer, K., Shah, A.R., Khatib, R., 2006. Interinstitutional and intrainstitutional transmission of a strain of *Acinetobacter baumannii* detected by molecular analysis: comparison of pulsed-field gel electrophoresis and repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 27, 981–983. doi:10.1086/507286

- Sarma, P.M., Bhattacharya, D., Krishnan, S., 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
- Schuetz, A.N., Huard, R.C., Eshoo, M.W., Massire, C., Della-Latta, P., Wu, F., 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. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2011.09.012
- Scott, P., Deye, G., Srinivasan, A., Murray, C., Moran, K., Hulten, E., Fishbain, J., Craft, D., Riddell, S., Lindler, L., Mancuso, J., Milstrey, E., Bautista, C.T., Patel, J., Ewell, A., Hamilton, T., Gaddy, C., Tenney, M., Christopher, G., Petersen, K., Endy, T., Petrucci, B., 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.* 44, 1577–1584. doi:10.1086/518170
- Sebeny, P.J., Riddle, M.S., Petersen, K., 2008. *Acinetobacter baumannii* skin and soft-tissue infection associated with war trauma. *Clin. Infect. Dis.* 47, 444–449. doi:10.1086/590568
- Šedo, O., Nemeč, A., Křížová, L., Kačalová, M., Zdráhal, Z., 2013. Improvement of MALDI-TOF MS profiling for the differentiation of species within the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex. *Syst. Appl. Microbiol.* 36, 572–578. doi:10.1016/j.syapm.2013.08.001
- Seifert, H., Dijkshoorn, L., 2008. Overview of the microbial characteristics, taxonomy, and epidemiology of *Acinetobacter*, in: Bergogne-Bérézin, E., Friedman, H., Bendinelli, M. (Eds.), *Acinetobacter* biology and pathogenesis. Springer, New York, US, pp. 19–45.
- Seifert, H., Dijkshoorn, L., Gerner-Smidt, P., Pelzer, N., Tjernberg, I., Vaneechoutte, M., 1997. Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2819–2825.
- Seifert, H., Dolzani, L., Bressan, R., van der Reijden, T., van Strijen, B., Stefanik, D., Heersma, H., Dijkshoorn, L., 2005. Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* 43, 4328–4335. doi:10.1128/JCM.43.9.4328-4335.2005
- Severino, P., Brisse, S., 2005. Ribotyping in clinical microbiology, in: Walker, J.M., Rapley, R. (Eds.), *Medical biometrics handbook*. Humana Press, Totowa, US, pp. 573–581.
- Silva, G.J., Mendonça, N., Batista, G., Duarte, A., 2010. Sequence types of Portuguese carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates collected over 10 years. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 2254–2256. doi:10.1093/jac/dkq274
- Smet, A., Boyen, F., Pasmans, F., Butaye, P., Martens, A., Nemeč, A., Deschaght, P., Vaneechoutte, M., Haesebrouck, F., 2012. OXA-23-producing *Acinetobacter* species from

- horses: a public health hazard? *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 3009–3010. doi:10.1093/jac/dks311
- Smith, M.G., Gianoulis, T.A., Pukatzki, S., Mekalanos, J.J., Ornston, L.N., Gerstein, M., Snyder, M., 2007. New insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis. *Genes Dev.* 21, 601–614. doi:10.1101/gad.1510307
- Sonnevend, A., Ghazawi, A., Al Munthari, N., Pitout, M., Hamadeh, M.B., Hashmey, R., Girgis, S.K., Sheikh, F.A., Al Haj, M., Nagelkerke, N., Pál, T., 2013. Characteristics of epidemic and sporadic strains of *Acinetobacter baumannii* isolated in Abu Dhabi hospitals. *J. Med. Microbiol.* 62, 582–590. doi:10.1099/jmm.0.055681-0
- Sousa, C., Botelho, J., Silva, L., Grosso, F., Nemec, A., Lopes, J., Peixe, L., 2014a. MALDI-TOF MS and chemometric based identification of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex species. *Int. J. Med. Microbiol.* 304, 669–677. doi:10.1016/j.ijmm.2014.04.014
- Sousa, C., Silva, L., Grosso, F., Nemec, A., Lopes, J., Peixe, L., 2014b. Discrimination of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex species by Fourier transform infrared spectroscopy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 33, 1345–1353. doi:10.1007/s10096-014-2078-y
- Stietz, M.S., Ramírez, M.S., Vilacoba, E., Merkier, A.K., Limansky, A.S., Centrón, D., Catalano, M., 2013. *Acinetobacter baumannii* extensively drug resistant lineages in Buenos Aires hospitals differ from the international clones I-III. *Infect. Genet. Evol.* 14, 294–301. doi:10.1016/j.meegid.2012.12.020
- Tian, G.B., Adams-Haduch, J.M., Taracila, M., Bonomo, R.A., Wang, H.N., Doi, Y., 2011. Extended-spectrum AmpC cephalosporinase in *Acinetobacter baumannii*: ADC-56 confers resistance to cefepime. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 4922–4925. doi:10.1128/AAC.00704-11
- Tjernberg, I., Ursing, J., 1989. Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 97, 595–605.
- Tokajian, S., Hashwa, F., 2004. Incidence of antibiotic resistance in coliforms from drinking water and their identification using the Biolog and the API identification systems. *J. Chemother.* 16, 45–50. doi:10.1179/joc.2004.16.1.45
- Tomaras, A.P., Dorsey, C.W., Edelman, R.E., Actis, L.A., 2003. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiol. Read. Engl.* 149, 3473–3484. doi:10.1099/mic.0.26541-0
- Tomaras, A.P., Flagler, M.J., Dorsey, C.W., Gaddy, J.A., Actis, L.A., 2008. Characterization of a two-component regulatory system from *Acinetobacter baumannii* that controls biofilm

- formation and cellular morphology. *Microbiol. Read. Engl.* 154, 3398–3409. doi:10.1099/mic.0.2008/019471-0
- Towner, K.J., 2006. The genus *Acinetobacter*, in: Dworkin, T., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes*. 3th ed. Springer, Singapore, volume 6, pp. 746–758. DOI: 10.1007/0-387-30746-x_25
- Towner, K.J., 2009. *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. *J. Hosp. Infect.* 73, 355–363. doi:10.1016/j.jhin.2009.03.032
- Turton, J.F., Gabriel, S.N., Valderrey, C., Kaufmann, M.E., 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.* 13, 807–815. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01759.x
- Turton, J.F., Matos, J., Kaufmann, M.E., Pitt, T.L., 2009. Variable number tandem repeat loci providing discrimination within widespread genotypes of *Acinetobacter baumannii*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 28, 499–507. doi:10.1007/s10096-008-0659-3
- Turton, J.F., Ward, M.E., Woodford, N., Kaufmann, M.E., Pike, R., Livermore, D.M., Pitt, T.L., 2006a. The role of IS*Aba1* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol. Lett.* 258, 72–77. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00195.x
- Turton, J.F., Woodford, N., Glover, J., Yarde, S., Kaufmann, M.E., Pitt, T.L., 2006b. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the *bla*_{OXA-51-like} carbapenemase gene intrinsic to this species. *J. Clin. Microbiol.* 44, 2974–2976. doi:10.1128/JCM.01021-06
- Uçkay, I., Sax, H., Harbarth, S., Bernard, L., Pittet, D., 2008. Multi-resistant infections in repatriated patients after natural disasters: lessons learned from the 2004 tsunami for hospital infection control. *J. Hosp. Infect.* 68, 1–8. doi:10.1016/j.jhin.2007.10.018
- Vahaboglu, H., Oztürk, R., Aygün, G., Coşkuncan, F., Yaman, A., Kaygusuz, A., Leblebicioglu, H., Balik, I., Aydin, K., 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.
- Vallenet, D., Nordmann, P., Barbe, V., Poirel, L., Mangenot, S., Bataille, E., Dossat, C., Gas, S., Kreimeyer, A., Lenoble, P., Oztas, S., Poulain, J., Segurens, B., Robert, C., Abergel, C., Claverie, J.M., Raoult, D., Médigue, C., Weissenbach, J., Cruveiller, S., 2008. Comparative analysis of *Acinetobacters*: three genomes for three lifestyles. *PloS One.* 3, e1805. doi:10.1371/journal.pone.0001805
- Van Belkum, A., Tassios, P.T., Dijkshoorn, L., Haeggman, S., Cookson, B., Fry, N.K., Fussing, V., Green, J., Feil, E., Gerner-Smidt, P., Brisse, S., Struelens, M., 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.* 13, 1–46.
- Van den Broek, P.J., Arends, J., Bernards, A.T., De Brauwier, E., Mascini, E.M., van der Reijden, T.J., Spanjaard, L., Thewessen, E.A., van der Zee, A., van Zeijl, J.H., Dijkshoorn, L., 2006. Epidemiology of multiple *Acinetobacter* outbreaks in The Netherlands during the period 1999-2001. *Clin. Microbiol. Infect.* 12, 837–843. doi:10.1111/j.1469-0691.2006.01510.x
- Van Dessel, H., Dijkshoorn, L., Van Der Reijden, T., Bakker, N., Paauw, A., Van Den Broek, P., Verhoef, J., Brisse, S., 2004. Identification of a new geographically widespread multiresistant *Acinetobacter baumannii* clone from European hospitals. *Res. Microbiol.* 155, 105–112. doi:10.1016/j.resmic.2003.10.003
- Vanechoutte, M., De Baere, T., 2008. Taxonomy of the genus *Acinetobacter*, based on 16S ribosomal RNA gene sequences, in: Gerischer, U. (Ed.), *Acinetobacter* molecular microbiology. Caister Academic Press, Norfolk, UK, pp. 35–60.
- Vanechoutte, M., Dijkshoorn, L., Nemec, A., Kämpfer, P., Wauters, G., 2011. *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella*, and other nonfermentative gram-negative rods, in: Versalovic, J., Carroll, K.C., Funke, G., Jorgensen, J.H., Landry, M.L., Warnock, D.W (Ed.), *Manual of clinical microbiology*. 10th ed. ASM Press, pp. 714–738.
- Vanechoutte, M., Dijkshoorn, L., Tjernberg, I., Elaichouni, A., de Vos, P., Claeys, G., Verschraegen, G., 1995. Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *J. Clin. Microbiol.* 33, 11–15.
- Vangnai, A.S., Petchkroh, W., 2007. Biodegradation of 4-chloroaniline by bacteria enriched from soil. *FEMS Microbiol. Lett.* 268, 209–216. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00579.x
- Vila, J., Ruiz, J., Goñi, P., Jimenez de Anta, T., 1997. Quinolone-resistance mutations in the topoisomerase IV *parC* gene of *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 39, 757–762.
- Villalón, P., Valdezate, S., Medina-Pascual, M.J., Carrasco, G., Vindel, A., Saez-Nieto, J.A., 2013. Epidemiology of the *Acinetobacter*-derived cephalosporinase, carbapenem-hydrolysing oxacillinase and metallo- β -lactamase genes, and of common insertion sequences, in epidemic clones of *Acinetobacter baumannii* from Spain. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 550–553. doi:10.1093/jac/dks448
- Villegas, M.V., Hartstein, A.I., 2003. *Acinetobacter* outbreaks, 1977-2000. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 24, 284–295. doi:10.1086/502205
- Vincent, J.L., Rello, J., Marshall, J., Silva, E., Anzueto, A., Martin, C.D., Moreno, R., Lipman, J., Gomersall, C., Sakr, Y., Reinhart, K., EPIC II Group of Investigators, 2009. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *J. Am. Med. Assoc.* 302, 2323–2329. doi:10.1001/jama.2009.1754

- Wang, Y., Hao, P., Lu, B., Yu, H., Huang, W., Hou, H., Dai, K., 2010. Causes of infection after earthquake, China, 2008. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 974–975. doi:10.3201/eid1606.091523
- Weernink, A., Severin, W.P., Tjernberg, I., Dijkshoorn, L., 1995. Pillows, an unexpected source of *Acinetobacter*. *J. Hosp. Infect.* 29, 189–199.
- 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., 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. doi:10.1128/mBio.00963-13
- Xiao, S.Z., Han, L.Z., Chu, H., Zhao, L., Chen, X., Ni, Y.X., 2014. Detection of aminoglycoside resistance related genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from a single institute of Shanghai, China. *Panminerva Med.*
- Yamamoto, S., Bouvet, P.J., Harayama, S., 1999. Phylogenetic structures of the genus *Acinetobacter* based on *gyrB* sequences: comparison with the grouping by DNA-DNA hybridization. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 87–95. doi:10.1099/00207713-49-1-87
- Yong, D., Toleman, M.A., Giske, C.G., Cho, H.S., Sundman, K., Lee, K., 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. doi:10.1128/AAC.00774-09
- Zander, E., Chmielarczyk, A., Heczko, P., Seifert, H., Higgins, P.G., 2013a. Conversion of OXA-66 into OXA-82 in clinical *Acinetobacter baumannii* isolates and association with altered carbapenem susceptibility. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 308–311. doi:10.1093/jac/dks382
- Zander, E., Fernández-González, A., Schleicher, X., Dammhayn, C., Kamolvit, W., Seifert, H., Higgins, P.G., 2014. Worldwide dissemination of acquired carbapenem-hydrolysing class D β -lactamases in *Acinetobacter* spp. other than *Acinetobacter baumannii*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 43, 375–377. doi:10.1016/j.ijantimicag.2014.01.012
- Zander, E., Higgins, P.G., Fernández-González, A., Seifert, H., 2013b. Detection of intrinsic *bla*_{OXA-51-like} by multiplex PCR on its own is not reliable for the identification of *Acinetobacter baumannii*. *Int. J. Med. Microbiol.* 303, 88–89. doi:10.1016/j.ijmm.2012.12.007
- Zander, E., Nemeč, A., Seifert, H., 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. doi:10.1128/JCM.06462-11
- Zarrilli, R., Pournaras, S., Giannouli, M., Tsakris, A., 2013. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 41, 11–19. doi:10.1016/j.ijantimicag.2012.09.008

- Zarrilli, R., Vitale, D., Di Popolo, A., Bagattini, M., Daoud, Z., Khan, A.U., Afif, C., Triassi, M., 2008. A plasmid-borne *bla*_{OXA-58} gene confers imipenem resistance to *Acinetobacter baumannii* isolates from a Lebanese hospital. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 4115–4120. doi:10.1128/AAC.00366-08
- Zeana, C., Larson, E., Sahni, J., Bayuga, S.J., Wu, F., Della-Latta, P., 2003. The epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: does the community represent a reservoir? *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 24, 275–279. doi:10.1086/502209
- Zeka, A.N., Poirel, L., Sipahi, O.R., Bonnin, R.A., Arda, B., Özinel, M., Ulusoy, S., Bor, C., Nordmann, P., 2014. GES-type and OXA-23 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in Turkey. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 1145–1146. doi:10.1093/jac/dkt465
- Zhang, B., Liu, Z., Lin, Z., Zhang, X., Fu, W., 2012. Microbiologic characteristics of pathogenic bacteria from hospitalized trauma patients who survived Wenchuan earthquake. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 31, 2529–2535. doi:10.1007/s10096-012-1591-0
- Zhang, W.J., Lu, Z., Schwarz, S., Zhang, R.M., Wang, X.M., Si, W., Yu, S., Chen, L., Liu, S., 2013. Complete sequence of the *bla*_{NDM-1}-carrying plasmid pNDM-AB from *Acinetobacter baumannii* of food animal origin. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 1681–1682. doi:10.1093/jac/dkt066
- Zhao, W.H., Hu, Z.Q., 2012. *Acinetobacter*: A potential reservoir and dispenser for β -lactamases. *Crit. Rev. Microbiol.* 38, 30–51. doi:10.3109/1040841X.2011.621064
- Zordan, S., Prenger-Berninghoff, E., Weiss, R., van der Reijden, T., van den Broek, P., Baljer, G., Dijkshoorn, L., 2011. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in veterinary clinics, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 1751–1754. doi:10.3201/eid1709.101931

Annexe A

Tableau représentant le numéro de la souche d'*A. baumannii*, le numéro de soumission à GenBank, le numéro d'accèsion de GenBank et le numéro de Lahey pour chaque nouveau variant d'OXA-51 découvert dans ce travail

Numéro des souches	Numéro de soumission (GenBank)	Numéro d'accèsion (GenBank)	Numéro d'OXA (Lahey)
SR17	BankItID1630023	KF048907	OXA-336
SR53	BankItID1630023	KF048908	OXA-337
SR144	BankItID1630023	KF048909	OXA-338
SR145	BankItID1630023	KF048910	OXA-106
SR147	BankItID1630023	KF048911	OXA-339
SR149	BankItID1630023	KF048912	OXA-340
SR150	BankItID1630023	KF048913	OXA-341
SR154	BankItID1630023	KF048914	OXA-69
SR156	BankItID1630023	KF048915	OXA-342
SR161	BankItID1630023	KF048916	OXA-343
SR173	BankItID1630023	KF048917	OXA-344
SR174	BankItID1630023	KF048918	OXA-345
SR181	BankItID1630023	KF048919	OXA-346
SR191	BankItID1707309	KJ584915	OXA-406
SR273	BankItID1707309	KJ584916	OXA-407
SR280	BankItID1707309	KJ584917	OXA-408
SR283	BankItID1707309	KJ584918	OXA-409
SR291	BankItID1707309	KJ584919	OXA-410
SR307	BankItID1707309	KJ584920	OXA-411

SR327	BankItID1707309	KJ584921	OXA-412
SR330	BankItID1707309	KJ584922	OXA-413
SR346	BankItID1707309	KJ584923	OXA-71
SR355	BankItID1707309	KJ584924	OXA-65
SR359	BankItID1707309	KJ584925	OXA-338

Annexe B

Résumé de la communication affichée présentée lors de la conférence internationale sur la biologie d'*Acinetobacter* à Cologne, Allemagne

Session: Global and Local Epidemiology of *Acinetobacter*

Numéro de poster: P5-7

Molecular epidemiology and carbapenem resistance mechanisms in *Acinetobacter baumannii* strains isolated from different environments in Lebanon

R. Rafei^{1,2*}, F. Dabboussi², M. Hamze², M. Eveillard¹, M.-L. Joly-Guillou¹, M. Kempf¹

¹L'UNAM Université, Université d'Angers, Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, UPRES EA3142, Institut de Biologie en Santé - IRIS, Angers, France, ²Microbiology Laboratory, AZM centre for research in Biotechnology and its application, Lebanese university, Tripoli, Lebanon

Objectives: To determine the epidemiology and characterize the carbapenem resistance mechanisms on *Acinetobacter* isolates recovered from different environments in Lebanon.

Methods: We analysed 71 strains identified phenotypically as *Acinetobacter baumannii* complex with API 20NE gallery. These strains were isolated between 2006-2012 from different environment conditions in Lebanon (26 environmental strains and 45 clinical strains isolated in different hospitals). Molecular species identification was performed by *bla*_{OXA-51-like} real time PCR assay and partial *rpoB* sequence analysis. Susceptibility testing was carried out by agar disc diffusion and Etest, and the presence of carbapenemase genes (*bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{OXA-143-like} and *bla*_{ndm-1}) was investigated by PCR assays.

Results: Among the 71 strains analysed, 45 harboured the *bla*_{OXA-51-like} gene (3 from environments and 42 from hospitals). These results were confirmed by partial *rpoB* sequence analysis. All 3 environmental *A. baumannii* strains were highly susceptible to the antibiotics tested. Besides, 31 clinical strains were resistant to carbapenems. Among them, 28 harboured the *bla*_{OXA-23-like} gene, one the *bla*_{OXA-24-like} gene, and 2 strains the *bla*_{OXA-58-like} gene.

Conclusion: *A. baumannii* was the most prevalent species in clinical settings, but also present in environment. Diverse carbapenem resistant mechanisms were found among our clinical collection and the *bla*_{OXA-23-like} carbapenemase was the main carbapenem resistant mechanism. These results show clearly an increasing need of effective measures to monitor further spread of such notorious carbapenem resistant isolates in Lebanon and to decipher the reservoir of such multi-drug resistant strains.

Thèse de Doctorat

Rayane RAFEI

Etude du réservoir d'*Acinetobacter baumannii* au Liban Study of *Acinetobacter baumannii* reservoir in Lebanon

Résumé

A. baumannii est une bactérie principalement responsable d'infections nosocomiales. Ce travail vise à étudier l'épidémiologie moléculaire de souches cliniques d'origine hospitalière et de souches isolées hors de tout contexte hospitalier au Liban.

Nous avons analysé des souches isolées d'hôpitaux, 66 % étaient résistantes aux carbapénèmes et le gène *bla*_{OXA-23-like} étant prépondérant. Le typage par multi locus sequence typing (MLST) a révélé la prédominance du ST2. Dix-sept autres ST(s), dont 6 nouveaux, ont par ailleurs été identifiés. Nous avons réalisé une analyse épidémiologique plus approfondie de 42 souches d'origine nosocomiale. Les résultats ont montré la présence d'un seul clone chez 28 souches réparties à Tripoli et à Beyrouth. L'épidémiologie extra-hospitalière a été étudiée sur des prélèvements collectés dans le Nord du Liban. 42 souches ont été identifiées dans l'environnement et chez des animaux. Contrairement aux souches cliniques, les souches étaient sensibles aux antibiotiques. Les résultats du typage par MLST ont montré la présence de 36 ST(s), dont 24 nouveaux. Le séquençage du gène *bla*_{OXA-51-like} a identifié 34 variants, dont 21 nouveaux.

Ce travail a permis de montrer que le Liban était un pays à forte endémie d'*A. baumannii* résistants aux carbapénèmes. Nous avons ainsi mis en évidence que les clones circulant dans l'environnement étaient globalement différents de ceux isolés lors d'infections chez l'homme. Cette étude montre qu'il n'y a pas de lien direct entre les souches cliniques et l'environnement extra-hospitalier mais qu'il existe une niche potentiellement animale qu'il conviendrait d'explorer par des études plus larges et détaillées.

Mots clés

Acinetobacter baumannii, Liban, épidémiologie hospitalière, épidémiologie extra-hospitalière, typage, résistance aux carbapénèmes, animaux.

Abstract

A. baumannii is a bacterium responsible for nosocomial infections. This work aims to study the molecular epidemiology of hospital-acquired strains and strains isolated outside the hospital setting in Lebanon.

We analyzed strains isolated in hospitals, 66% were resistant to carbapenems and *bla*_{OXA-23-like} was the dominant. Typing by multi locus sequence typing (MLST) revealed the predominance of ST2. Seventeen other ST (s), including 6 new, were also identified. We conducted a more thorough epidemiological analysis of 42 strains of nosocomial origin. The results showed the presence of a single clones spread to Tripoli and Beirut. Extra hospital epidemiology was studied on samples collected in northern Lebanon. 42 strains have been identified in the environment and in animals. Unlike clinical strains, the strains were susceptible to antibiotics. The results of MLST typing showed the presence of 36 ST(s), including 24 new ones. The sequencing of *bla*_{OXA-51-like} gene identified 34 variants, including 21 new ones.

This work has shown that Lebanon is a country with high endemicity of *A. baumannii* resistant to carbapenems. We have thus demonstrated that the clones circulating in the environments were generally different from those isolated during infections in humans. This study shows that there is no direct link between clinical strains and extra hospital environment but a potentially animal niche that should be explored by broader and detailed studies.

Key Words

Acinetobacter baumannii, Lebanon, hospital epidemiology, extra-hospital epidemiology, typing, carbapenem resistance, animals.