

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
FACULTAD DE MEDICINA  
Departamento de Microbiología I



**TESIS DOCTORAL**

**Clonalidad y resistencia de *Acinetobacter baumannii* y *Acinetobacter* spp**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Pilar Villalón Panzano**

Directores

**Juan Antonio Sáez Nieto**  
**Sylvia Valdezate Ramos**

**Madrid, 2017**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE MEDICINA

DPTO. MICROBIOLOGÍA I



**“CLONALIDAD Y RESISTENCIA DE**

*Acinetobacter baumannii* Y *Acinetobacter* spp.

**EN LA INFECCIÓN NOSOCOMIAL”**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR  
PILAR VILLALÓN PANZANO

DIRECTORES: DR. JUAN ANTONIO SÁEZ NIETO  
DRA. SYLVIA VALDEZATE RAMOS

MADRID, 2015





Memoria presentada en la Facultad de Medicina  
de la Universidad Complutense de Madrid  
por Dña. Pilar Villalón Panzano  
para la obtención del grado de doctor

### **Directores**

Dr. Juan Antonio Sáez Nieto  
Área de Bacteriología.  
Centro Nacional de Microbiología.  
Instituto de Salud Carlos III

Dra. Sylvia Valdezate Ramos  
Área de Bacteriología.  
Centro Nacional de Microbiología.  
Instituto de Salud Carlos III





**Juan Antonio Sáez Nieto**, Jefe de Área de Bacteriología del Centro Nacional de Microbiología, del Instituto de Salud Carlos III, y

**Sylvia Valdezate Ramos**, Científico Titular del Organismo Público de Investigación del Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III,

Por la presente certifican que la memoria titulada “**Clonalidad y resistencia de *Acinetobacter baumannii* y *Acinetobacter* spp. en la infección nosocomial**”, ha sido realizada bajo nuestra dirección por la doctoranda Pilar Villalón Panzano en el Laboratorio de Taxonomía, del Área de Bacteriología del Centro Nacional de Microbiología, y estimando que se encuentra finalizada y en condiciones de optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid, sea admitida a trámite para su lectura y defensa pública.

Madrid, a 16 de octubre de 2015

Dr. Juan Antonio Sáez Nieto

Dr. Sylvia Valdezate Ramos



*A papá y mamá*



## **AGRADECIMIENTOS**

A mis directores de tesis, Juan y Sylvia. Por ayudarme a crecer profesionalmente.

A Juan, por acogerme en el laboratorio, por confiar en mí y por darme libertad en el trabajo. A Sylvia, por tu amistad, dedicación, disponibilidad y cariño. Sin ti, esto no habría sido posible.

A mis amigas y compañeras del laboratorio. Las que estáis y las que estuvisteis. Por vuestro compañerismo. Y por vuestra ayuda y paciencia, especialmente durante este último año.

A mi familia. A los que se fueron. A los viejitos. A mis tres hermanos. A mi hermana, mi regalo. Y a todos los demás que me acompañáis.

A mis amigas, porque la amistad entre mujeres es el mejor de los vinos. A ellos también.

A mi Amor. Donde te halles.

¡Va por ustedes!



## LISTADO DE ABREVIATURAS

Abc	Complejo <i>Acinetobacter baumannii-calcoaceticus</i>
ADC	Cefalosporinasa derivada de <i>Acinetobacter</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AFLP	Polimorfismo en el tamaño de los fragmentos amplificados
ARDRA	Análisis de restricción del amplificado del gen del ARNr 16S
ARNr	ARN ribosomal
ARNt	ARN transferente
BIMP	Familia de transportadores (bacterial integral membrane protein).
CHO	Oxacilinasas hidrolizadoras de carbapenémicos
CMI	Concentración mínima inhibitoria
EDTA	Ácido etilén-diamino-tetraacético
ER	Enzima de restricción
ESI-MS	Espectrometría de masas con ionización por electropulverización
ID	Índice de diversidad
LPS	Lipopolisacárido
MALDI-TOF MS	Espectrometría de masas asistida por matriz con desorción/ionización por láser y con analizador de tiempo de vuelo
MATE	Familia de transportadores (multidrug and toxic comp. extrusion).

MBL	Metalo- $\beta$ -lactamasa
MDRAB	<i>Acinetobacter baumannii</i> multirresistente
MFS	Familia de transportadores (major facilitator superfamily)
MLST	Tipificación por secuenciación de múltiples loci
MLVA	Análisis en múltiples loci del número variable de secuencias repetidas en tándem
OMP	Proteína de membrana externa
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFGE	Electroforesis en campo pulsante
RAPD-PCR	ADN polimórfico amplificado aleatoriamente por PCR
REP-PCR	PCR de palíndromos extragénicos repetitivos
RND	Familia de transportadores (resistance-nodulation-cell division)
SG	Secuenciogrupo
SI	Secuencia de inserción
ST	Secuenciotipo
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
VNTR	Número variable de secuencias repetidas en tándem
XDR	Resistencia extensa a antimicrobianos

# ÍNDICE

<b>SUMMARY</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	9
<b>1. El género <i>Acinetobacter</i></b> .....	11
1.1. Antecedentes históricos y taxonomía .....	11
1.2. El complejo <i>Acinetobacter baumannii-calcoaceticus</i> .....	13
1.3. Características microbiológicas.....	14
1.4. Hábitat natural .....	15
<b>2. Identificación molecular de especies del género <i>Acinetobacter</i></b> .....	16
2.1. Hibridación ADN-ADN.....	17
2.2. Ribotipado.....	18
2.3. AFLP o polimorfismo en el tamaño de los fragmentos amplificados.....	18
2.4. ARDRA o análisis de restricción del amplificado del gen del ARNr 16S .	19
2.5. Secuenciación del gen del ARNr 16S o gen <i>rrs</i> .....	19
2.6. Huella dactilar de los espaciadores del ADNt .....	20
2.7. Secuenciación de la región intergénica espaciadora 16-23S del ADNr.....	20
2.8. Análisis de genes codificantes de proteínas: <i>rpoB</i> y <i>gyrB</i> .....	20
2.8.1. Secuenciación del gen <i>rpoB</i> .....	20
2.8.2. Amplificación de fragmentos del gen <i>gyrB</i> .....	22
2.9. PCR/ESI-MS o PCR multilocus asociada a espectrometría de masas con ionización por electropulverización.....	22

2.10.	Detección del gen <i>bla</i> <sub>OXA-51-like</sub> .....	22
2.11.	MALDI-TOF MS o espectrometría de masas asistida por matriz con desorción/ionización por láser y con analizador de tiempo de vuelo .....	23
3.	Patogenia de <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	24
3.1.	Factores de virulencia y patogénesis .....	24
3.2.	La infección por <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	27
3.2.1.	Infecciones más frecuentes .....	27
3.2.2.	Impacto clínico de la infección por <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	30
4.	<i>Acinetobacter baumannii</i> y los antimicrobianos .....	31
4.1.	Mecanismos de resistencia a antimicrobianos.....	31
4.1.1.	Mecanismos de resistencia a $\beta$ -lactámicos.....	31
4.1.2.	Mecanismos de resistencia a antibióticos no $\beta$ -lactámicos.....	36
4.2.	Opciones terapéuticas en la infección por <i>Acinetobacter baumannii</i> multirresistente .....	37
5.	Epidemiología de <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	38
5.1.	Persistencia de <i>Acinetobacter baumannii</i> en el ambiente hospitalario .....	38
5.2.	Brotos nosocomiales .....	39
5.3.	Medidas de control de brotes.....	42
5.4.	Técnicas moleculares de tipificación epidemiológica.....	44
5.4.1.	Análisis plasmídico .....	45
5.4.2.	Ribotipado .....	45
5.4.3.	Métodos de tipificación basados en la PCR.....	45

5.4.4. PCR/ESI-MS.....	47
5.4.5. PCR multiplex y secuenciación de los genes <i>ompA</i> , <i>csuE</i> y <i>bla<sub>OXA-51-like</sub></i> .....	47
5.4.6. PFGE o electroforesis en campo pulsante.....	48
5.4.7. MLST o tipificación por secuenciación de múltiples loci .....	50
5.4.8. MLVA o análisis en múltiples loci del número variable de secuencias repetidas en tándem (VNTR) .....	51
<b>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b> .....	53
<b>MATERIAL Y MÉTODOS, Y RESULTADOS</b> .....	57
1. Artículo 1.....	59
Permisos .....	60
Clonal diversity of nosocomial epidemic <i>Acinetobacter baumannii</i> strains isolated in Spain .....	61
2. Artículo 2.....	69
Permisos .....	71
Epidemiology of the <i>Acinetobacter</i> -derived cephalosporinase, carbapenem- hydrolysing oxacillinase and metallo- $\beta$ -lactamase genes, and common insertion sequences, in epidemic clones of <i>Acinetobacter baumannii</i> from Spain .....	73

3. Artículo 3.....	79
Permisos .....	80
Outbreak of multiresistant <i>Acinetobacter baumannii</i> in a polyvalent intensive care unit: clinical, epidemiological analysis and PFGE-printing evolution .....	83
4. Artículo 4	
Permisos .....	87
Endemic and epidemic <i>Acinetobacter baumannii</i> clones: a twelve-year study in a tertiary care hospital.....	89
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>99</b>
1. Artículo 1.....	103
2. Artículo 2.....	111
3. Artículo 3.....	117
4. Artículo 4.....	124
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>131</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>137</b>

# SUMMARY

---



**TITLE:** Clonality and resistance of *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* spp. in nosocomial infection

## **INTRODUCTION**

*Acinetobacter baumannii* is one of the major pathogens involved in nosocomial outbreaks. Its ability to develop resistance to antimicrobial agents afford *A. baumannii* the possibility of spreading in hospitals. The clonal study of hospital strains is very important in terms of an understanding of the epidemiology of the outbreaks.

This dissertation includes four research articles which expose different epidemiological situations. Article 1 shows a molecular typing study of epidemic clones from 19 hospitals in Spain over an 11-year period. Article 2 analyzes the genetic determinants of  $\beta$ -lactamases in the population of epidemic clones characterized in article 1. Article 3 analyzes an outbreak of extensively drug-resistant (XDR) *A. baumannii* in an intensive care unit (ICU). Article 4 examines the genetic diversity of endemic and epidemic *A. baumannii* clones isolated in a single hospital over a 12-year period.

## **OBJECTIVES**

1. To analyze the genetic diversity and clonal distribution of epidemic strains of *A. baumannii* isolated from around Spain over an 11-year period by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), sequencing of the *rpoB* gene, and multilocus sequence typing (MLST).

2. To verify the usefulness of partial sequencing of the *rpoB* gene for the identification of *A. baumannii* species in a wide epidemic population.
3. To know the antimicrobial susceptibility pattern of *A. baumannii* epidemic strains in Spain.
4. To study the distribution, diversity and activity of *Acinetobacter*-derived cephalosporinase (ADC)-, carbapenem-hydrolysing oxacillinase (CHO)- and metallo- $\beta$ -lactamase (MBL)-encoding genes, and of the common insertion sequences (ISs), in the genome of nosocomial, epidemic *A. baumannii* clones from Spain.
5. To characterize by PFGE typing the epidemiological features of an outbreak of extensively drug-resistant *A. baumannii* in an ICU.
6. To study the endemic and epidemic clones of *A. baumannii* in a single hospital over a 12-year period and to compare them with other epidemic clones circulating in Spain by PFGE, MLST, and multiple locus variable number tandem repeat (VNTR) analysis (MLVA).

## RESULTS

**Article 1:** The analysis of 729 epidemic strains identified 58 PFGE types that were grouped into 16 clones based on their genetic similarity. The *rpoB* gene sequencing and MLST results reflected a clonal distribution, in agreement with the PFGE results. The MLST sequence types (STs) were as follows: ST-2 (47.5%), ST-3 (5.1%), ST-15 (1.7%), ST-32 (1.7%), ST-79 (13.6%), ST-80 (20.3%), and ST-81

(10.2%). International clones I, II, and III were represented by ST-81, ST-2, and ST-3, respectively. All PFGE types were multidrug resistant; colistin was the only agent to which all pathogens were susceptible.

**Article 2:** The most prevalent IS, *ISAb<sub>1</sub>* (93.2%), was detected upstream of *bla<sub>ADC</sub>* and *bla<sub>OXA-51-like</sub>*. *bla<sub>OXA-58-like</sub>* was carried by 20.3% of strains, in association with *ISAb<sub>2</sub>*, *ISAb<sub>3</sub>* or *IS18*. *bla<sub>OXA-40-like</sub>* was the most prevalent acquired CHO gene (57.6%), and was associated with none of the studied ISs. Neither *bla<sub>OXA-23-like</sub>* nor *ISAb<sub>4</sub>* was detected in any strain.

**Article 3:** An outbreak of XDR *A. baumannii* occurred in an adult ICU, caused by . four highly-related PFGE types. Successive isolation of a single PFGE type was identified from five of ten patients; in the other five patients, two or three PFGE types were detected. The outbreak was controlled by an extensive infection control program.

**Article 4:** PFGE analysis detected 15 *A. baumannii* endemic/epidemic PFGE types (EE1 to EE15) that grouped into five clusters: EE1-EE8, EE9, EE10, EE11 and EE12-EE15. The MLST sequence type distributions were: international clone II (ST-2) 60%, international clone III (ST-3) 26.7%, ST-15 6.7%, and ST-80 6.7%. MLVA-8<sub>Orsay</sub> returned 17 allelic profiles. The large (L) VNTR marker profiles were fully concordant with the detected STs, and concordant with 14 up to 15 PFGE types. Imipenem resistance was detected in five PFGE types; and the prevalence of *bla<sub>OXA-40-like</sub>* and *bla<sub>OXA-58-like</sub>* was 60% and 40% respectively.

## CONCLUSIONS

1. PFGE is a vital typing method for *A. baumannii* outbreaks studies that offers exhaustive information due to its high discriminatory power. It provides much in-depth knowledge regarding their epidemiology, in local setting studies and even in nationwide comparisons.
2. PFGE typing of *A. baumannii* isolates provides the ability to differentiate sporadic and epidemic isolates; to know the clonal complexity of outbreaks, and the temporal and spatial distribution of the clones; and to demonstrate the long persistence of endemic clones in the hospital, and the the inter- and intrahospital transmission of clones.
3. MLST of *A. baumannii* epidemic isolates groups the strains into clonal clusters, allowing the large-scale monitoring of the national and international epidemic clones.
4. PFGE and MLST are concordant and complementary epidemiological typing tools in clonality studies of *A. baumannii*.
5. International clone II is the most representative epidemic clone in Spain, is detected in more than 50% of the studied isolates, and is represented by ST-2. Two novel sequencetypes, ST-79 and ST-80, might be emerging clones in an expansion process. Clone international I, and clone international III have a minority presence.
6. Partial sequencing of the *rpoB* gene is a useful tool for identifying *A. baumannii* species. *rpoB* types correlated with PFGE types.

7. In Spain, *A. baumannii* epidemic isolates show an extensively drug-resistant pattern, with 75% of imipenem resistance and full susceptibility to colistin.
8. IS*Aba1* is the most common IS, located upstream of *bla*<sub>ADC</sub> and *bla*<sub>OXA-51-like</sub>. The carbapenemase OXA-23 is absent, even though it has been found worldwide. OXA-24 is the main factor affording resistance to imipenem, followed by OXA-58. MBLs genes are also absent.
9. In a monoclonal outbreak caused by XDR *A. baumannii*, an evolution of the predominant PFGE type 1 was detected in half of the patients with repetitive episodes.
10. MLVA-8<sub>Orsay</sub> method involves four L-VNTR markers that provide similar information than MLST, grouping the isolates into clonal clusters. This method also involves four S-VNTR markers, but the variability associated with them is so great that it has not been possible to define agreed criteria for establishing MLVA clonal complexes.

MLVA could be an excellent typing method for *A. baumannii* if new S-VNTR markers were added to MLVA panel and criteria for MLVA clustering were established by consensus. MLVA reveals clonal relationships similar to those provided by MLST analysis, and provides information at least as discriminative as PFGE.



# INTRODUCCIÓN

---



## 1. El género *Acinetobacter*

### 1.1. Antecedentes históricos y taxonomía

En 1911 Beijerinck describió un microorganismo que había aislado del suelo y al que denominó *Micrococcus calcoaceticus*, debido a que lo había cultivado en un caldo de enriquecimiento que contenía acetato de calcio. Se trataba de la primera especie descrita del género *Acinetobacter*, actualmente reconocida como *Acinetobacter calcoaceticus* [Beijerinck, 1911].

Las siguientes décadas se caracterizaron por la confusión desde un punto de vista taxonómico. Se fueron describiendo distintas especies de acinetobacterias, algunas de las cuales permanecen todavía sin una identificación formal. En algunos casos, las especies descritas se incluyeron inicialmente en otros géneros; como *Micrococcus*, *Moraxella* o *Achromobacter*; aunque tras reclasificación, hoy están formalmente incluidas en el género *Acinetobacter*.

El nombre del género *Acinetobacter* fue propuesto por Brisou y Prévot en 1954. En cuanto a su etimología, la palabra “*Acinetobacter*” proviene del griego; “*a*” actúa como partícula negativa, “*kinetos*” significa “móvil”, y “*bakter*” significa “bacilo”. El nombre “*Acinetobacter*” describe por tanto, un grupo de bacterias inmóviles con morfología bacilar [Brisou, 1954].

Sin embargo, el género *Acinetobacter* no fue incluido en el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey hasta 1971, describiéndose en ese momento *A. calcoaceticus* como única especie

En 1986 Bouvet y Grimont describieron una nueva clasificación del género basada en la hibridación ADN-ADN y en características nutricionales. Describieron 12 especies genómicas o genopecies diferentes (1 - 12) [Bouvet, 1986]. En 1989 Tjernberg y Ursing describieron tres genopecies adicionales (13TU - 15TU). Simultáneamente, Bouvet y Jeanjean describieron cinco grupos genómicos de especies proteolíticas (13BJ - 17BJ) [Bouvet, 1989]. Este hecho creó cierta confusión porque se les adjudicó el mismo número a diferentes genopecies; sirva como ejemplo que la geno especie 14TU equivale a la geno especie 13BJ [Tjernberg, 1989].

Actualmente, el género *Acinetobacter* está clasificado en el dominio *Bacteria* o *Eubacteria*, filum *Proteobacteria*, clase *Gammaproteobacteria*, orden *Pseudomonadales*, y familia *Moraxellaceae*, que incluye los géneros *Acinetobacter*, *Psychrobacter*, *Moraxella* y *Branhamella* entre otros. Hasta el momento, hay descritas 39 especies (<http://www.bacterio.net/acinetobacter.html>) de *Acinetobacter*. La tabla 1 recoge las geno especies anteriormente referidas y las especies equivalentes.

**Tabla 1. Genoespecies y especies de *Acinetobacter***

Genoespecie	Especie
1	<i>A. calcoaceticus</i>
2	<i>A. baumannii</i>
3	<i>A. pittii</i>
4	<i>A. haemolyticus</i>
5	<i>A. junii</i>
6	<i>Acinetobacter</i> genoespecie 6
7	<i>A. johnsonii</i>
8	<i>A. lwoffii</i>
9	<i>Acinetobacter</i> genoespecie 9
10	<i>A. bereziniae</i>
11	<i>A. guillouiae</i>
12	<i>A. radioresistens</i>
13TU <sup>a</sup>	<i>A. nosocomialis</i>
14TU <sup>a</sup>	<i>Acinetobacter</i> genoespecie 14TU
15TU <sup>a</sup>	<i>Acinetobacter</i> genoespecie 15TU
13BJ <sup>b</sup>	<i>Acinetobacter</i> genoespecie 13BJ
14BJ <sup>b</sup>	<i>A. lwoffii</i>
15BJ <sup>b</sup>	<i>Acinetobacter</i> genoespecie 15BJ
16	<i>Acinetobacter</i> genoespecie 16
17	<i>Acinetobacter</i> genoespecie 17

<sup>a</sup> Según esquema de clasificación de genoespecies de Tjerberg y Ursing [Tjerberg, 1989]

<sup>b</sup> Según esquema de clasificación de genoespecies de Bouvet y Jeanjean [Bouvet, 1989]

## 1.2. El complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus*

El complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* (Abc) está constituido por cuatro especies del género *Acinetobacter*: *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. pittii* y *A. nosocomialis*. Estas cuatro especies están estrechamente relacionadas y no son distinguibles fenotípicamente, requiriéndose métodos moleculares para discernirlas correctamente.

*A. calcoaceticus* y *A. baumannii* se corresponden respectivamente con las genoespecies 1 y 2 descritas por Bouvet y Grimont. Posteriormente se identificaron las especies *A. pittii* y *A. nosocomialis* [Nemec, 2011]. *A. pittii* es equivalente a la genoespecie 3, mientras que *A. nosocomialis* se corresponde con la genoespecie 13TU.

El complejo Abc incluye las tres especies de *Acinetobacter* más frecuentemente aisladas tanto en infecciones adquiridas en la comunidad como en infecciones nosocomiales. *A. baumannii* es con diferencia la especie más frecuente en muestras clínicas, seguida de *A. pittii* y *A. nosocomialis*. Sin embargo, la especie *A. calcoaceticus*, aunque está incluida en el complejo Abc, es ambiental y ha sido frecuentemente aislada de suelo y agua, pero hasta el momento no está clara su implicación clínica [Peleg, 2008].

### **1.3. Características microbiológicas**

Las bacterias del género *Acinetobacter* son cocobacilos Gram-negativos que tienen un tamaño de 1-1,5 µm por 1,5-2,5 µm. Carecen de motilidad y con frecuencia se agrupan en parejas.

Son bacterias aerobias y por ello, necesitan oxígeno para vivir. Esta característica es fácilmente observable porque crecen abundantemente en la superficie de medios como KIA (Kligler Iron Agar) y TSI (Triple Sugar Iron), pero no crecen ni acidifican el fondo.

Su metabolismo es no fermentador. Las pruebas bioquímicas de la oxidasa, la reducción de nitratos a nitritos y la hidrólisis de la esculina dan resultados negativos que son característicos de este género.

Son microorganismos mesófilos con una temperatura óptima de crecimiento alrededor de los 37 °C. La restricción de crecimiento a temperaturas más elevadas se emplea como estrategia para seleccionar determinadas especies. El crecimiento a 41 °C es positivo para *A. baumannii*, *A. pittii* y *A. junii*; mientras que el resto de especies no crecen a esta temperatura. Sin embargo, el crecimiento a 44 °C es sólo positivo para *A. baumannii*.

Tras 24 h de incubación a 37 °C en agar sangre, las colonias del complejo Abc son convexas, lisas, con aspecto de translúcido a opaco y coloración blanco-grisácea.

#### **1.4. Hábitat natural**

En conjunto, los miembros del género *Acinetobacter* son ubicuos. Están presentes en el ambiente y forman parte de la flora de animales y humanos. La distribución de las distintas especies en la naturaleza es muy variable.

En cuanto a la colonización de la piel humana por acinetobacterias, se observan diferencias relacionadas con el clima y la variación estacional. En climas templados se aíslan con frecuencia especies como *A. lwoffii*, *A. johnsonii*, *A. junii*, y con menor frecuencia *A. pittii* [Seifert, 1997]. No es habitual en este tipo de clima que las especies del complejo Abc formen parte de la flora cutánea, ni tampoco

son frecuentes los portadores fecales [Dijkshoorn, 2005]. Sin embargo, en climas tropicales, la presencia del complejo Abc es predominante en la piel. [McDonald, 1999].

Teniendo en cuenta los datos ofrecidos por diversos estudios [Peleg, 2008], las especies del complejo Abc presentan una distribución diferente entre sí. *A. calcoaceticus* se ha aislado en agua, suelo y plantas; *A. pittii* en agua, suelo, plantas y piel humana; *A. nosocomialis* en piel humana, esencialmente en clima tropical; y *A. baumannii* en suelo y plantas, siendo raros los portadores naturales humanos. En cualquier caso, *A. baumannii* no forma parte de la flora cutánea habitual en humanos y todavía se conoce poco acerca de su ubicación ambiental natural.

El estudio de especies de *Acinetobacter* de origen no humano; realizado en aislados de agua, suelo, alimentos y animales; ha apuntado recientemente la existencia de reservorios animales de clones multirresistentes de *A. baumannii* portadores de carbapenemasas de alta actividad [Rafei, 2015]. Desafortunadamente, el hábitat natural tanto de *A. baumannii* como de *A. nosocomialis* permanece todavía por dilucidar.

## **2. Identificación molecular de especies del género**

### ***Acinetobacter***

El esquema de identificación propuesto por Bouvet y Grimont en 1986 se basa en 28 pruebas fenotípicas. Entre ellas incluye el crecimiento a 37, 41 y 44 °C, la producción de ácido a partir de glucosa, la hidrólisis de gelatina y la

asimilación de 14 fuentes de carbono. Sin embargo, las pruebas fenotípicas tradicionales no son adecuadas para la identificación sin ambigüedades de las especies de *Acinetobacter*. Los sistemas comerciales de identificación, basados en galerías de pruebas bioquímicas, no distinguen entre las diferentes especies del complejo Abc.

Las técnicas moleculares son, por consiguiente, necesarias para la identificación correcta de las especies [Peleg, 2008]. A continuación se exponen las más importantes, algunas de las cuales solo son factibles en laboratorios de referencia debido a que son laboriosas, requieren un largo tiempo para su realización, aparataje costoso y personal especializado.

## **2.1. Hibridación ADN-ADN**

Cuantifica la homología existente entre el ADN cromosómico de dos organismos. Cuando el ADN desnaturalizado de dos bacterias se incuba en condiciones adecuadas, se forma un dúplex híbrido. El grado de similitud entre las secuencias nucleotídicas se cuantifica en base a la estabilidad térmica del híbrido [Yamamoto, 1999]. Aunque es considerada la técnica de referencia en identificación, no discierne bien entre *A. lwoffii* y *Acinetobacter* gen. sp. 9.

## **2.2. Ribotipado**

Basado en el análisis del ADN mediante procedimientos de restricción e hibridación. El ADN cromosómico se digiere con varias enzimas de restricción (ERs), se separan los fragmentos por electroforesis, se transfieren las bandas del gel a un soporte sólido y se hibrida con una sonda marcada de ADNc que reconoce los operones del ARNr 16S y 23S. Cuanto mayor sea el número de copias del operón, mayor será la capacidad discriminativa del ribotipado. Algunos polimorfismos son específicos de especie, mientras que otros permiten discriminar a un nivel infraespecífico. Esto la convierte en una técnica con aplicaciones tanto taxonómicas como epidemiológicas. En taxonomía se ha empleado principalmente para identificar las especies del complejo *Abc* con buenos resultados [Gerner-Smidt, 1992].

## **2.3. AFLP o polimorfismo en el tamaño de los fragmentos amplificados**

Técnica muy sensible de huella molecular del ADN. Este es digerido con dos ERs con distinta frecuencia de corte, seguido de la amplificación selectiva de los fragmentos mixtos cortados en cada extremo con un ER distinto, la posterior separación electroforética de los fragmentos y su visualización. Este método suele estar semiautomatizado, con la detección de los fragmentos en una plataforma de secuenciación láser. Los perfiles obtenidos son complejos y se digitalizan y analizan con programas informáticos apropiados [Janssen, 1996].

## **2.4. ARDRA o análisis de restricción del amplificado del gen del ARNr 16S**

Los amplificados por PCR del gen del ARNr 16S se separan en cinco alícuotas y cada una se digiere con un ER distinto. Los fragmentos de restricción se separan por electroforesis. Finalmente, se comparan los perfiles resultantes de la combinación de los diferentes patrones de restricción con los registrados en una librería de perfiles de cepas de especies ya descritas. Es, junto con el AFLP, una de las técnicas de identificación más ampliamente aceptadas y validadas con el estudio de un gran número de cepas de referencia de todas las especies de *Acinetobacter* [Peleg, 2008].

## **2.5. Secuenciación del gen del ARNr 16S o gen *rrs***

Constituye la herramienta más utilizada en estudios de taxonomía y filogenia bacteriana [Drancourt, 2000]. El gen *rrs* está altamente conservado aunque presenta variaciones concentradas en zonas específicas. La mayor variabilidad se concentra en los primeros 500 pb del extremo 5'; sin embargo, no presenta suficiente polimorfismo para identificar correctamente todas las especies de *Acinetobacter*, especialmente las del complejo Abc.

## 2.6. Huella dactilar de los espaciadores del ADNt

Se amplifican las regiones espaciadoras situadas entre los genes del ARNt [Ehrenstein, 1996]. El patrón de amplificadas es analizado por un secuenciador y expresado en forma de densitograma. Cada especie presenta un patrón de densidades característico. Sin embargo, esta técnica no discrimina entre *A. baumannii* y *A. nosocomialis*, ni tampoco entre *A. calcoaceticus* y *A. pittii*.

## 2.7. Secuenciación de la región intergénica espaciadora 16-23S del ADNr

La región espaciadora que separa los genes del ARNr 16S y 23S es un buen marcador taxonómico porque presenta una variación intraespecífica baja y una divergencia interespecífica elevada. Es eficaz en la diferenciación de especies del complejo Abc pero no se ha empleado en el análisis de otras especies de *Acinetobacter* [Chang, 2005].

## 2.8. Análisis de genes codificantes de proteínas: *rpoB* y *gyrB*

El gen *rpoB* codifica la subunidad  $\beta$  de la ARN polimerasa; y *gyrB*, la subunidad  $\beta$  de la ADN girasa. Estos genes poseen regiones funcionales conservadas y flanqueadas por regiones variables que pueden emplearse para diferenciar especies genéticamente relacionadas.

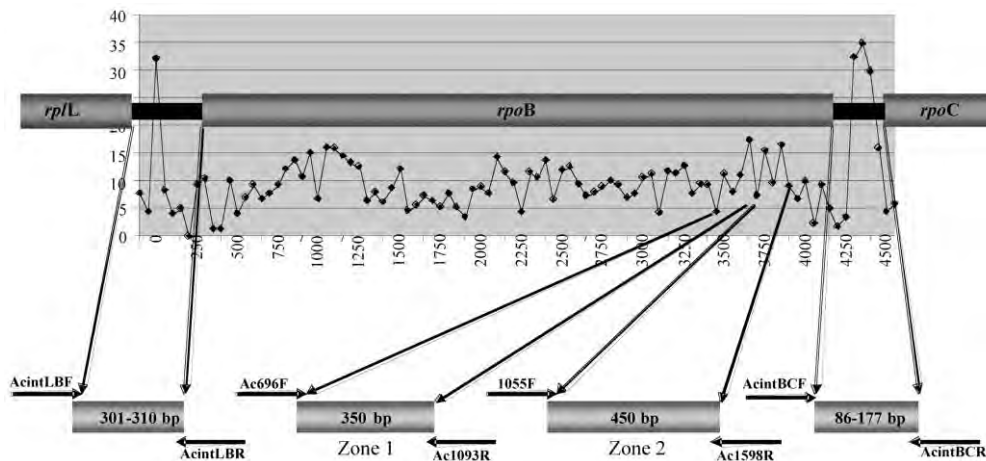
### 2.8.1. Secuenciación del gen *rpoB*

Amplificación por PCR y secuenciación parcial del gen *rpoB* y de los fragmentos espaciadores flanqueantes [La Scola, 2006]. Incluye el análisis de

cuatro regiones de alta variabilidad: dos zonas polimórficas dentro del gen *rpoB* y las dos regiones que flanquean este gen. Es una técnica rápida y segura para la identificación de especies. Uno de los fragmentos de *rpoB*, conocido como zona 1, ha mostrado ser el más útil y además diferencia bien las especies del complejo Abc. El análisis de los otros fragmentos completa el esquema de identificación. Se han detectado problemas en la diferenciación de algunas especies como *A. baylyi* vs. *Acinetobacter* gen. sp. 9. La figura 1 muestra el gen *rpoB* y las regiones flanqueantes estudiadas, así como los cebadores empleados.

**Figura 1. Variabilidad de secuencia del gen *rpoB* y las regiones flanqueantes**

Graphical representation of range site variability in *rpoB* gene and spacer sequences of *Acinetobacter* species in the present study using SVARAP software.



Bernard La Scola et al. J. Clin. Microbiol. 2006;44:827-832

Journal of Clinical Microbiology

Journals.ASM.org | Copyright © American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

### 2.8.2. Amplificación de fragmentos del gen *gyrB*

PCR multiplex basada en diferencias específicas de secuencia en el gen *gyrB* [Higgins, 2007; Higgins, 2010-a]. El polimorfismo en los tamaños de los amplicones permite diferenciar con rapidez las cuatro especies del complejo Abc

### 2.9. PCR/ESI-MS o PCR multilocus asociada a espectrometría de masas con ionización por electropulverización

Técnica muy rápida que combina la amplificación por PCR con el análisis posterior por espectrometría de masas [Ecker, 2006]. Se amplifican regiones conservadas de seis genes domésticos y se determina la composición de bases de los amplificados con los espectros de masas obtenidos. Tiene utilidad en la identificación de especies de *Acinetobacter* y también en la tipificación epidemiológica de *A. baumannii*.

### 2.10. Detección del gen *bla*<sub>OXA-51-like</sub>

Amplificación por PCR del gen de la carbapenemasa OXA-51, intrínseco en *A. baumannii*. Su presencia no debe interpretarse como criterio definitivo de identificación de esta especie. Aunque puede emplearse como confirmación de la identificación previa por otras técnicas [Pournaras, 2014].

## **2.11. MALDI-TOF MS o espectrometría de masas asistida por matriz con desorción/ionización por láser y con analizador de tiempo de vuelo**

Aunque no es una técnica genotípica, se trata de un método molecular de análisis del proteoma. La bacteria a identificar se mezcla con una matriz que soporta la reacción inicial. Esta preparación se irradia con láser, lo que provoca la ionización de la muestra y la desorción de los iones de la fase sólida a gaseosa. Los iones generados se separan en un campo eléctrico, acelerándose en función de su relación carga/masa. Los más ligeros experimentan una mayor aceleración, viajan más rápido y llegan primero al detector. Los iones se separan, por tanto, en función del tiempo de vuelo. En el detector se genera el perfil o huella química específico de la muestra. El espectro obtenido se compara con los perfiles registrados en bases de datos.

La identificación bacteriana se basa en la detección del perfil de proteínas ribosómicas, ya que constituyen el 80-90% de las señales del espectro. MALDI-TOF MS es un método eficaz en la identificación de un amplio rango de microorganismos. Sin embargo, disponer de una buena base de datos es fundamental para realizar una identificación correcta.

Una vez salvados los problemas iniciales derivados del empleo de bases de datos incompletas del propio sistema; la identificación de especies de

*Acinetobacter* por MALDI-TOF MS, incluido el complejo Abc, está consiguiendo actualmente resultados prometedores [Pailhoriès, 2015].

### **3. Patogenia de *Acinetobacter baumannii***

#### **3.1. Factores de virulencia y patogénesis**

*A. baumannii* es una especie para la que hay pocos factores de virulencia identificados en comparación con otros patógenos bacterianos de relevancia clínica. Aún así, hay una serie de factores de virulencia reconocidos como los más específicos en *A. baumannii*, entre los que se incluyen la formación de biopelículas, la adherencia, los sistemas de captura de hierro, el lipopolisacárido (LPS) y las proteínas de membrana externa (OMPs) [Gordon, 2010].

También son factores de virulencia importantes los mecanismos de resistencia a antisépticos y antimicrobianos [Fournier, 2006-a]. Estos últimos adquieren una dimensión especial en *A. baumannii* porque son la causa de la aparición de aislados multirresistentes. Merecen, por consiguiente, un apartado específico en la introducción de esta memoria que será abordado más adelante.

Estudios genómicos en *A. baumannii* han identificado genes implicados en la autoinducción [Gordon, 2010], sistema de regulación de la expresión génica mediado por sustancias, los autoinductores, que son secretadas por las bacterias. Es un mecanismo cuantitativo, asociado a la densidad de población; de forma que cuando el número de bacterias alcanza un nivel umbral, las sustancias

secretadas y reguladoras también lo hacen. Esa concentración elevada de sustancias en el medio dispara los mecanismos de regulación genética. La unión del inductor a su receptor estimula la transcripción de determinados genes. Es un mecanismo de regulación colectivo, a nivel de población. Entre otros, se estimulan diversos mecanismos de virulencia, como la formación de biopelículas, además de mecanismos de resistencia.

La capacidad de algunas bacterias para formar biopelículas sobre material inerte es un factor de virulencia que podría explicar el éxito de *A. baumannii* en el ambiente hospitalario [Peleg, 2008]. Esta capacidad facilita la colonización bacteriana del material protésico siendo un primer paso para la infección. Además, las biopelículas son una barrera física que dificulta el acceso de sustancias solubles y células al material colonizado, contribuyendo a la resistencia a fármacos y a la evasión del sistema inmune del huésped. La formación de biopelículas está asociada a la formación de pili y la producción de exopolisacárido. Pili y fimbrias son importantes para la adhesión inicial, y posteriormente la producción de exopolisacárido protege a la bacteria de los mecanismos de defensa del huésped [Gordon, 2010]. En la formación de biopelículas están implicadas una gran variedad de rutas metabólicas reguladas, a su vez, por autoinducción. La variación en la expresión de factores implicados en esas rutas específicas influye en la capacidad de las cepas para colonizar o infectar el huésped.

El mecanismo de adherencia a células epiteliales es distinto al de superficies inanimadas. Tras la adhesión, *A. baumannii* invade las células del huésped y promueve la apoptosis. Esta propiedad se le atribuye a la proteína OmpA que se dirige hacia la mitocondria y el núcleo e induce rutas metabólicas de muerte celular [Gordon, 2010].

La capacidad de *A. baumannii* de captar hierro es otro factor de supervivencia en el huésped y en el medio ambiente deficitarios en este metal. Para ello secreta componentes de bajo peso molecular que unen hierro, conocidos como sideróforos, entre los que destaca la actinobactina; y además posee un sistema de utilización de hemina [Gordon, 2010]. Hay una amplia variabilidad en la expresión de moléculas implicadas en la captura de hierro, incluso entre cepas de un mismo brote.

El LPS es el factor inmunoestimulador más eficaz en bacterias Gram-negativas. Es una potente endotoxina inductora de la expresión de citoquinas proinflamatorias en monocitos, estimulando una fuerte respuesta inflamatoria y siendo, por tanto, un contribuyente importante en la patogénesis de la infección.

También hay una respuesta inmune humoral por parte del huésped frente a distintos componentes de *A. baumannii*. Se han detectado anticuerpos frente a OMPs captadoras de hierro y el componente O del LPS [Gordon, 2010].

La transferencia de genes de virulencia se produce de unas bacterias a otras. Es conocido que algunos de los genes de virulencia de *A. baumannii* son originarios de otros patógenos como *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp. y *E. coli*. También se ha descrito en el genoma de *A. baumannii* la presencia de islas de patogenicidad, que concentran elementos de transposición y recombinación, así como determinantes de resistencia y de virulencia implicados en la envuelta celular, la biogénesis de pili, y la captura y metabolismo del hierro [Fournier, 2006-b].

### **3.2. La infección por *Acinetobacter baumannii***

Las infecciones por *A. baumannii* tienen lugar fundamentalmente en el ámbito hospitalario. Las infecciones adquiridas en la comunidad son, por el contrario, excepcionales y van generalmente asociadas a factores ambientales de tipo climático.

Factores de riesgo importantes para desarrollar una infección por *A. baumannii* son el tratamiento antibiótico previo, la cirugía previa, la instrumentación invasiva, la estancia en UCI y la hospitalización prolongada [Maragakis, 2008].

#### **3.2.1. Infecciones más frecuentes**

Hay una gran variedad de infecciones asociadas al complejo Abc y especialmente a *A. baumannii* [Peleg, 2008]. A continuación se describen las más frecuentes.

### **Neumonía nosocomial**

Con diferencia es la infección nosocomial más frecuente por *A. baumannii*. Está muy asociada con la traqueostomía e intubación traqueal en pacientes sometidos a ventilación mecánica en las UCIs. En estas circunstancias, el tubo endotraqueal supone una vía de entrada para las bacterias, y su colonización un paso previo necesario para la infección pulmonar.

### **Neumonía adquirida en la comunidad**

Se trata de un tipo de neumonía descrita en zonas tropicales húmedas de Australia y Asia. Los afectados suelen ser portadores faríngeos. El alcoholismo y el tabaquismo son factores de riesgo asociados. Presenta un curso fulminante, con bacteriemia secundaria y mortalidad elevada.

### **Infecciones de piel y heridas**

*A. baumannii* produce ocasionalmente infección nosocomial en heridas y tejidos blandos. Sin embargo es habitual en pacientes con quemaduras, siendo difícil su erradicación aunque no se conoce bien el papel que juega en la mala evolución de estos pacientes.

Ha sido un agente frecuente en heridas de guerra en soldados procedentes de Irak y Afganistán. Sin embargo, en estos pacientes no se ha manifestado con gran patogenicidad, al margen de tratarse de aislados multirresistentes implicados en numerosos brotes nosocomiales [Maragakis, 2008].

Una característica habitual de este tipo de infecciones es la colonización previa de las heridas por cepas de *A. baumannii* presentes en el ambiente hospitalario.

### **ITU o infección del tracto urinario**

*A. baumannii* causa ITU de forma ocasional. Lo más frecuente son las ITUs adquiridas en las UCIs, asociadas a colonización de catéter.

### **Bacteriemia/Sepsis**

*A. baumannii* no está entre los agentes causales más frecuentes de bacteriemias nosocomiales. Es más habitual en pacientes de UCI y suele ser secundaria a neumonía, ITU o heridas. La mortalidad asociada es elevada, aunque no está demostrado si es por la virulencia de la bacteria o por factores de riesgo asociados al prototipo de paciente afectado.

### **Meningitis**

Lo más característico es la meningitis nosocomial postquirúrgica, en pacientes con drenaje ventricular externo. La tendencia de la infección por *A. baumannii* multirresistente en este tipo de pacientes va en aumento, al igual que para otros Gram-negativos multirresistentes.

### **Otras infecciones**

Hay descrito un amplio abanico de infecciones poco frecuentes producidas por *A. baumannii*. Son destacables algunos casos raros de endocarditis, la mayoría asociados a válvulas protésicas; peritonitis en pacientes sometidos a diálisis peritoneal; infecciones oculares como conjuntivitis, endoftalmitis y queratitis,

asociadas al uso de lentes de contacto o complicaciones postquirúrgicas; y casos esporádicos de osteomielitis y sinovitis.

### **3.2.2. Impacto clínico de la infección por *Acinetobacter baumannii***

Hay una falta de consenso para la valoración del impacto clínico de la infección por *A. baumannii* en términos de morbilidad y mortalidad que se puede atribuir a varias causas [Gordon, 2010].

Por un lado está la dificultad para discernir entre colonización e infección. Esto es debido a los datos limitados sobre la patogénesis de esta bacteria y a que el paciente prototipo afectado está en estado crítico, intubado con ventilación mecánica y en muchos casos, tiene mal pronóstico.

Por otro lado, hay una amplia heterogeneidad metodológica en el diseño de los estudios realizados (retrospectivos y prospectivos, de cohortes pareados, de casos y controles, etc), una gran variación en la definición de casos *vs.* controles de unos estudios a otros (infección por *A. baumannii* *vs.* otras infecciones bacterianas, infecciones polimicrobianas *vs.* infecciones monomicrobianas, etc), y una falta de correspondencia apropiada entre estudios respecto a las comorbilidades subyacentes de los pacientes afectados [Gordon, 2010].

Tampoco se ha observado una elevación clara de la mortalidad en los pacientes infectados por *A. baumannii* multirresistente y aquellos que no lo están. En cuanto a la morbilidad, en el primer grupo la duración de la estancia en UCI y

de la hospitalización en general es mayor que en el segundo grupo [Maragakis, 2008].

## **4. *Acinetobacter baumannii* y los antimicrobianos**

### **4.1. Mecanismos de resistencia a antimicrobianos**

*A. baumannii* tiene una gran capacidad para desarrollar mecanismos de resistencia frente a distintos grupos de antimicrobianos. Ante la presión ambiental adecuada se seleccionan los organismos capaces de sobrevivir. Este fenómeno explica la emergencia a nivel global de cepas multirresistentes en el ámbito hospitalario.

Los mecanismos de resistencia tienen su origen en la sobrerregulación de mecanismos innatos y en la adquisición de determinantes de resistencia de otros organismos. En estos procesos intervienen elementos genéticos móviles conjugativos, integrones, secuencias de inserción (SIs) y mecanismos naturales de transformación [Touchon, 2014].

#### **4.1.1. Mecanismos de resistencia a $\beta$ -lactámicos**

Los mecanismos responsables de la resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos son la actividad de  $\beta$ -lactamasas, los cambios en OMPs, las bombas de expulsión, y las alteraciones en la afinidad o en la expresión de las proteínas de unión a penicilinas (PBPs). La tabla 2 resume los principales mecanismos de resistencia a  $\beta$ -lactámicos detectados en *A. baumannii*.

Tabla 2. Resistencia a  $\beta$ -lactámicos en *Acinetobacter baumannii*

Mecanismo resistencia	Clase/Familia	Proteína/Enzima	Referencias	
$\beta$ -lactamasas	C			
	ADC	ADC	Bou, 2000-a Hujer, 2005	
	A			
	BLEE	VEB PER TEM SHV CTX-M	Poirel, 2003 Vahaglobu, 2001 Naiemi, 2005 Naiemi, 2005 Nagano, 2004	
	carbapenemasas	GES KPC	Moubarek, 2009 Robledo, 2010	
	D			
	CHO	Grupo OXA-51 Grupo OXA-23 Grupo OXA-40 Grupo OXA-58 OXA-143	Brown, 2005 Corvec, 2007 Bou, 2000-c Poirel, 2005 Higgins, 2009	
	B			
	MBL	VIM IMP SIM NDM	Yum, 2002 Chu, 2001 Lee K, 2005 Karthikeyan, 2010	
	Pérdida de OMPs		CarO HMP-AB	Limansky, 2002 Gribun, 2003
	Bombas de expulsión	RND	AdeABC	Magnet, 2001
	Alteraciones PBPs		PBPs	Cayô, 2011

El mecanismo más prevalente es la degradación enzimática por la acción de  $\beta$ -lactamasas. El conjunto de las  $\beta$ -lactamasas descritas en *A. baumannii* se caracteriza por la variabilidad, con distintos representantes de la clasificación de Ambler [Ambler, 1980] y con espectros de acción muy diversos. Algunas son de naturaleza innata, mientras que otras son adquiridas por mecanismos de transferencia de genes entre bacterias.

Una primera clase de  $\beta$ -lactamasas intrínsecas la conforman las cefalosporinas derivadas de *Acinetobacter* (ADCs), inicialmente descritas como cefalosporinas cromosómicas tipo AmpC. El determinante que regula la expresión de las ADCs es la secuencia de inserción *ISAba1*, que cuando se sitúa río arriba del gen *ADC* provoca su sobreexpresión [Héritier, 2006]. El fenotipo resultante es resistente a cefalosporinas de amplio espectro, mientras que permanece sensible a cefepime y carbapenémicos.

Entre las enzimas de clase A se han descrito diversas  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEEs), por ejemplo tipo VEB, PER, TEM, SHV o CTX-M. Estas confieren resistencia a monobactámicos y cefalosporinas, no hidrolizan cefamicinas ni carbapenémicos, y son inhibidas por el ácido clavulánico. Excepcionalmente, también se han detectado carbapenemasas de clase A del tipo GES y KPC.

Las  $\beta$ -lactamasas de clase D descritas en *A. baumannii* hidrolizan activamente la oxacilina y la cloxacilina. Por ello, se conocen como  $\beta$ -lactamasas tipo OXA y también como oxacilinasas hidrolizadoras de carbapenémicos (CHOs) debido a su actividad carbapenemasa.

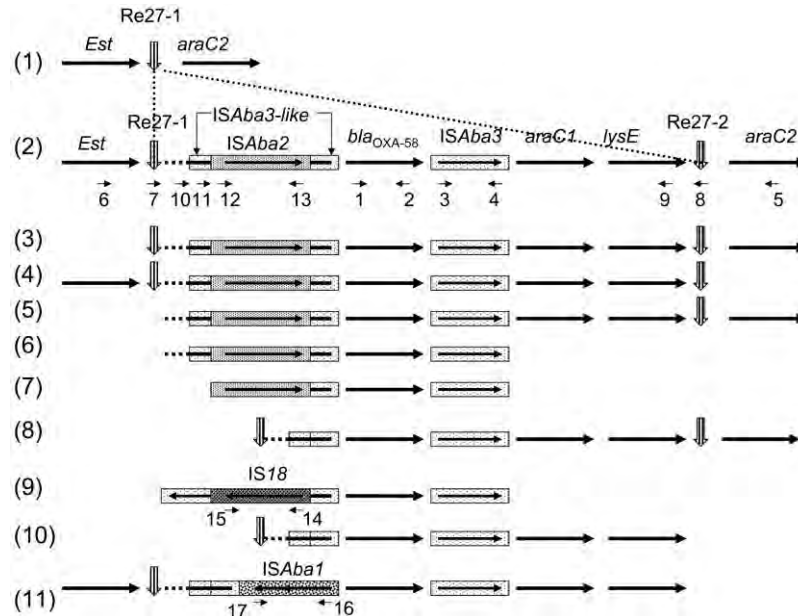
Hay descritos cuatro grupos principales de CHOs: OXA-51, OXA-23, OXA-40 y OXA-58. Aunque también se han detectado excepcionalmente otras CHOs como OXA-143. El grupo OXA-51 está codificado por los genes *bla*<sub>OXA-51-like</sub> intrínsecos de localización cromosómica. Su nivel de expresión está condicionado por *ISAba1*, la SI que situada río arriba de OXA-51 aumenta su expresión.

Cuando *ISAb1* está ausente, la actividad carbapenemasa de OXA-51 es mínima. Esto es lo que sucede en las cepas silvestres sensibles a carbapenémicos [Turton, 2006].

Las CHOs adquiridas pertenecen a los grupos OXA-23, OXA-40 y OXA-58, codificadas por los genes *bla*<sub>OXA-23-like</sub>, *bla*<sub>OXA-40-like</sub> y *bla*<sub>OXA-58-like</sub> respectivamente. En los tres casos pueden ser de localización tanto cromosómica como plasmídica. La primera en describirse pertenece al grupo OXA-23, fue inicialmente denominada ARI-1, se ha encontrado asociada a *ISAb1* e *ISAb4* [Corvec, 2007], y tiene una amplia distribución mundial aunque no se había registrado ningún caso en España hasta el año 2013. OXA-40 es la CHO adquirida más frecuente en España [Villalón, 2013; Acosta, 2011], sus genes no presentan SIs asociadas y tiene una distribución mundial más restringida que OXA-23 aunque está en clara expansión. El grupo OXA-58 también tiene una prevalencia mundial elevada y se ha descrito asociado a *ISAb1*, *ISAb2*, *ISAb3*, e *IS18* [Poirel, 2006-b]. La actividad carbapenemasa de estas CHOs adquiridas es variable, siendo OXA-23 y OXA-40 más activas que OXA-58. La expresión tanto de OXA-23 como de OXA-40 va asociada a CMIs a imipenem elevadas, mientras que la expresión de OXA-58 se corresponde con CMIs más moderadas [Héritier, 2005]. La figura 2 muestra la localización de SIs en aislados positivos para *bla*<sub>OXA-58-like</sub>.

**Figura 2. Estructuras génicas en aislados de *A. baumannii* bla<sub>OXA-58-like</sub> positivos**

Schematic map of bla<sub>OXA-58</sub>-positive structures identified in *A. baumannii* isolates.



Laurent Poirel, and Patrice Nordmann *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006;50:1442-1448

Antimicrobial Agents and Chemotherapy

Journals.ASM.org | Copyright © American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Un último tipo mucho menos frecuente de carbapenemasas detectadas en *A. baumannii* son las metalo-β-lactamasas (MBLs). Pertenecen a la clase B y su nombre se debe a la presencia de Zn<sup>2+</sup> en su centro activo. Son muy potentes y tienen una actividad 100-1000 veces superior a las CHOs. Hidrolizan todos los β-lactámicos salvo el aztreonam. En *A. baumannii* se han descrito MBLs de los tipos IMP, VIM, SIM y NDM. Los genes de MBLs se localizan frecuentemente asociados a genes de resistencia a aminoglucósidos en integrones de clase 1.

#### 4.1.2. Mecanismos de resistencia a antibióticos no $\beta$ -lactámicos

La tabla 3 expone los mecanismos de resistencia para los antibióticos no  $\beta$ -lactámicos que presentan actividad frente a *A. baumannii*.

**Tabla 3. Resistencia a antibióticos no  $\beta$ -lactámicos en *Acinetobacter baumannii***

Antimicrobianos	Mecanismo resistencia	Proteína/Enzima	Referencias	
<b>Aminoglucósidos</b>	Modificación enzimática	Acetiltransferasas	Nemec, 2004-b	
		Nucleotidiltransferasas		
		Fosfotransferasas		
	Metilación del ARNr 16S	ArmA RmtA, RmtB, RmtC, RmtD	Yamane, 2005	
	Bombas de expulsión	RND	Magnet, 2001 Su, 2005	
		MATE		
		AbeM		
<b>Quinolonas</b>	Mutaciones	ADN girasa	Lee JK, 2005	
		ADN topoisomerasa IV		
	Bombas de expulsión	RND	Magnet, 2001 Su, 2005	
		MATE		
<b>Tetraciclinas</b>	Bombas de expulsión	MFS	Huys, 2005	
		RND	Magnet, 2001	
		Protección del ribosoma	TetM	Ribera, 2003
<b>Glicilglicinas</b>	Bombas de expulsión	RND	Magnet, 2001	
<b>Cotrimoxazol</b>	Dihidropteroato sintetasa	SuII/II	Segal, 2005-b	
	Dihidrofolato reductasa	FoIA	Mak, 2009	
	Bombas de expulsión	RND	AdeABC AdeIJK	Magnet, 2001 Damier-Piolle, 2008
<b>Cloranfenicol</b>	Inactivación enzimática	O-acetiltransferasa	CAT	Peleg, 2008
	Bombas de expulsión	RND	AdeABC AdeIJK	Magnet, 2001 Damier-Piolle, 2008
		MFS	CmlA CraA	Fournier, 2006-b Roca, 2009
		BIMP	AbeS	Srinivasan, 2009
<b>Polimixinas</b>	Modificación del LPS	PmrA/PmrB	Olaitan, 2014	
	Pérdida del LPS	LpxA	Olaitan, 2014	
		LpxC LpxD		

## 4.2. Opciones terapéuticas en la infección por *Acinetobacter baumannii* multirresistente

Algunos antimicrobianos que presentan actividad potencial frente a las cepas silvestres de *A. baumannii* son las penicilinas y cefalosporinas de amplio espectro con actividad antipseudomónica, monobactámicos, carbapenémicos, sulbactam, tetraciclinas y glicilglicinas, aminoglucósidos, fluoroquinolonas y polimixinas. Sin embargo, la presencia de cepas multirresistentes es frecuente en las infecciones producidas por esta bacteria, limitando las opciones terapéuticas a un grupo reducido de antimicrobianos [Gilad, 2008].

Los carbapenémicos, especialmente el imipenem, continúan siendo el tratamiento de elección en infecciones graves cuando las cepas permanecen sensibles.

El sulbactam es el único inhibidor de  $\beta$ -lactamasas que tiene actividad intrínseca frente a *Acinetobacter*. Debe considerarse una opción terapéutica para infecciones de moderadas a graves pero no debe administrarse en monoterapia en infecciones graves [Maragakis, 2008].

Los aminoglucósidos tobramicina y amikacina son opciones terapéuticas que, por lo general, se administran de forma combinada con otros antibióticos.

La colistina se puede considerar como el tratamiento de segunda opción frente a cepas multirresistentes. Estudios recientes apuntan que puede ser tan

segura y eficaz como otros antibióticos de referencia en el tratamiento de la infección por *A. baumannii* [Liu, 2014].

## 5. Epidemiología de *Acinetobacter baumannii*

### 5.1. Persistencia de *Acinetobacter baumannii* en el ambiente hospitalario

Aunque todavía hay incógnitas por resolver acerca del hábitat natural de *A. baumannii*, es bien conocida su capacidad para colonizar el ambiente hospitalario y persistir con el tiempo. Precisamente, es la persistencia la principal causa de que esta bacteria se haya convertido en un problema endémico en muchos hospitales en todo el mundo.

Son tres los factores principales que contribuyen en la persistencia: la resistencia a los principales antimicrobianos, la resistencia a la desecación y la resistencia a los desinfectantes [Fournier, 2006-a].

La resistencia a los antimicrobianos confiere a los microorganismos una ventaja selectiva en aquel entorno ambiental donde existe una exposición intensa a los antibióticos, como sucede en los hospitales. Las cepas epidémicas de *A. baumannii* son característicamente multirresistentes. De hecho, la resistencia a quinolonas y carbapenémicos se ha identificado como un factor de riesgo para la aparición de brotes [Maragakis, 2008]. Por el contrario, las cepas esporádicas suelen presentar un patrón sensible a antimicrobianos.

La tolerancia a la desecación es similar en cepas epidémicas y esporádicas de *A. baumannii*. El número de días de supervivencia en el ambiente es superior a los valores registrados para enterobacterias [Gayoso, 2013]. Sin embargo, esta tolerancia es menor en otras especies de *Acinetobacter*. Este hecho, unido a un perfil más sensible a los antibióticos, puede explicar por qué otras especies de este género están raramente implicadas en brotes hospitalarios.

En *A. baumannii* se han descrito genes de resistencia a varios metales pesados, principalmente arsénico y mercurio, y a componentes de amonio cuaternario [Fournier, 2006-a]. Sin embargo, la comparación de las actividades *in vitro* de varios desinfectantes ha puesto de manifiesto recientemente que todos son activos ante las recomendaciones de concentración y de tiempos de contacto del fabricante. Pero cuando no se siguen estas recomendaciones, hay bacterias que permanecen viables [Wisplinhoff, 2007]. El empleo inadecuado de los desinfectantes puede jugar un papel importante en la transmisión cruzada de la bacteria. No se han observado diferencias entre cepas epidémicas y esporádicas.

## **5.2. Brotes nosocomiales**

La persistencia endémica de *A. baumannii* en el ambiente es un factor de riesgo para la aparición de brotes nosocomiales [Fournier, 2006-a]. *A. baumannii* tiene una gran capacidad para desarrollar mecanismos de resistencia frente a distintos grupos de antimicrobianos. La exposición continua a los antibióticos en los hospitales selecciona las cepas multirresistentes que están presentes en el

ambiente. Estas cepas pueden colonizar todo tipo de superficies inanimadas; como el mobiliario, equipos informáticos, instrumental médico y de enfermería; e incluso, la piel y vestuario tanto de los pacientes como del personal sanitario. La colonización de piel y mucosas de pacientes en situaciones especiales de morbilidad constituye un primer paso para el desarrollo de una infección por *A. baumannii*. Cuando confluyen todas estas circunstancias, las cepas endémicas pueden ocasionar brotes infecciosos que se caracterizan por un aumento por encima de lo esperado del número de pacientes afectados en un determinado periodo de tiempo y en una zona circunscrita del hospital. Una característica fundamental que presentan las cepas epidémicas de *A. baumannii* es la multirresistencia; es decir, la resistencia a varios grupos de antimicrobianos de utilidad terapéutica, especialmente a los carbapenémicos.

Las unidades de los hospitales más afectadas por brotes de *A. baumannii* son aquellas donde se asiste al paciente en situación crítica, como las UCIs y unidades de quemados. Esto se debe a que en estas unidades confluyen varios factores de riesgo [Maragakis, 2008]. Entre ellos está la exposición masiva a antibióticos de amplio espectro, como las fluoroquinolonas y los carbapenémicos. Otro factor es el empleo de técnicas de instrumentación invasiva; como la intubación traqueal, sondaje urinario, o derivación ventricular. Estas técnicas favorecen la colonización por bacterias nosocomiales del material utilizado, actuando como una vía de entrada de los microorganismos al interior del huésped.

Los primeros brotes nosocomiales empezaron a investigarse en Europa en los años 1980s empleando métodos epidemiológicos de tipificación molecular. Inicialmente se describieron tres grandes clones europeos que posteriormente fueron identificados como los clones internacionales I, II y III. Estos métodos de estudio permitieron demostrar la transmisión interhospitalaria de cepas epidémicas. Esta transmisión se ha observado no solamente entre hospitales de una misma ciudad, sino también a nivel nacional, internacional entre países europeos, e incluso a nivel intercontinental [Towner, 2009].

En América del Norte se han detectado numerosos brotes de *A. baumannii* multirresistente desde los años 1990s. Durante las dos décadas siguientes, los soldados norteamericanos que lucharon en las guerras de Irak y Afganistán contribuyeron en la epidemiología de esta bacteria tras su repatriación. En estos pacientes se observó un aumento en las infecciones por *A. baumannii*. Los estudios epidemiológicos evidenciaron que los pacientes no eran infectados en el momento de producirse las heridas ni tampoco por estar colonizados por la bacteria antes de herirse. Lo que se detectó, sin embargo, fue la presencia de la bacteria en superficies inanimadas de los hospitales de campaña. Estas cepas ambientales se relacionaron genotípicamente con las cepas aisladas de las muestras clínicas. Con el traslado de los repatriados, el problema se trasladó de los hospitales de campaña a los hospitales receptores de soldados heridos [Maragakis, 2008].

Por añadidura, cada vez es mayor el número de brotes descritos en otras zonas geográficas, especialmente en países de América del Sur y Asia. De esta forma queda patente que la capacidad de *A. baumannii* multirresistente de causar brotes nosocomiales constituye un problema sanitario de alcance mundial [Higgins, 2010-b].

### **5.3. Medidas de control de brotes**

Ante una situación de brote nosocomial causado por *A. baumannii* multirresistente, pueden ponerse en marcha una serie de intervenciones de control de la infección que se enuncian a continuación.

#### **Procedimientos de gestión del uso de los antibióticos.**

El objetivo es asegurar un uso moderado de los antibióticos que aumentan el riesgo de aparición de cepas multirresistentes; especialmente las cefalosporinas de amplio espectro, los carbapenémicos y las fluoroquinolonas.

#### **Procedimientos de limpieza y desinfección.**

La limpieza y desinfección del ambiente y equipos que rodean a los enfermos es esencial para controlar la transmisión de infecciones nosocomiales. Se deben tener en cuenta todo tipo de superficies inanimadas.

#### **Procedimientos de aislamiento.**

El objetivo es evitar la transmisión cruzada de las cepas de unos pacientes a otros. El aislamiento debe ser de contacto y requiere el uso de guantes y batas tanto para atender a los pacientes afectados como para desenvolverse en su

ambiente. Además, la higiene de manos es una prioridad en estos procedimientos.

El aislamiento es la medida de control más complicada de llevar a la práctica debido a las limitaciones en infraestructuras y personal sanitario disponible. Lo ideal es que los pacientes se aíslen individualmente y sean atendidos exclusivamente por un solo miembro del personal de enfermería.

### **Cultivos microbiológicos.**

Los cultivos de muestras ambientales son fundamentales para conocer un posible foco ambiental de la bacteria causante del brote. En caso de encontrarlo, habría que eliminarlo con los procedimientos de limpieza y desinfección. Las fuentes de contaminación ambiental identificadas en estudios previos son numerosas: tubos de ventilación mecánica, humidificadores, recipientes de recolección de orina, viales de medicación multidosis, nutriciones parenterales, medidores de presión arterial, teclados de ordenador, etc [Maragakis, 2008].

### **Estudios de epidemiología molecular.**

Las investigaciones de epidemiología molecular (apartado 5.4) son esenciales para confirmar la presencia de cepas epidémicas y también para tipificar la población de clones epidémicos presentes en los hospitales.

Todas estas medidas han probado su efectividad en el control de las infecciones epidémicas por *A. baumannii* [Towner, 2009]. Algunas son medidas básicas de higiene para prevenir la transmisión paciente-paciente, como la decontaminación ambiental y la higiene de manos. La monitorización de las

intervenciones de control es importante para asegurar su cumplimiento. A pesar de los esfuerzos realizados en muchos hospitales, continúan apareciendo brotes que a veces son muy difíciles de erradicar, requiriendo incluso el cierre temporal de las unidades afectadas.

#### **5.4. Técnicas moleculares de tipificación epidemiológica**

El control de la diseminación de *A. baumannii* en el hospital requiere la identificación de posibles reservorios ambientales del microorganismo y de sus mecanismos de transmisión. Para este propósito es necesaria la realización de cultivos microbiológicos de muestras ambientales y clínicas y el posterior análisis de las bacterias aisladas. Pero para distinguir las cepas causantes de un brote de otras cepas epidemiológicamente no relacionadas es necesario comparar los aislados a nivel de subespecie. Para este propósito se emplean técnicas epidemiológicas de tipificación bacteriana.

Entre los métodos fenotípicos de estudio destacan el biotipado basado en perfiles bioquímicos, los patrones de susceptibilidad a antibióticos, el serotipado basado en reacciones serológicas y la fagotipia [Peleg, 2008]. Estas técnicas fenotípicas han sido ampliamente reemplazadas por técnicas moleculares. A continuación se describen las técnicas moleculares más destacables aplicadas al estudio epidemiológico de *A. baumannii*.

#### **5.4.1. Análisis plasmídico**

La mayoría de las especies de *Acinetobacter* contienen plásmidos silvestres. Por este motivo, el análisis plasmídico es uno de los pocos métodos empleados en el estudio epidemiológico de especies no pertenecientes al complejo Abc.

Es un método robusto pero, debido a que muchos plásmidos son transferibles, el perfil plasmídico puede cambiar durante un episodio epidémico. Este hecho contribuyó en el reemplazamiento de este método por otros métodos no sujetos a esta variabilidad.

#### **5.4.2. Ribotipado**

Descrito en el apartado 2.2 de identificación molecular de especies de *Acinetobacter*. En tipificación epidemiológica, el ribotipado automatizado presenta un poder de discriminación similar a la electroforesis en campo pulsante (PFGE) y ofrece resultados con una rapidez similar, pero es costoso y requiere equipo y personal especializado sólo disponible en laboratorios de referencia.

#### **5.4.3. Métodos de tipificación basados en la PCR**

RAPD-PCR o ADN polimórfico amplificado aleatoriamente por PCR es una técnica que ha sido empleada con éxito para relacionar aislados de *Acinetobacter*. Consiste en una amplificación por PCR múltiple y arbitraria. Se amplifican fragmentos aleatorios del ADN genómico utilizando cebadores individuales de secuencia arbitraria. El número y localización de las regiones

reconocidas por los cebadores varía entre las cepas de una misma especie bacteriana [Peleg, 2008].

REP-PCR o PCR de palíndromos extragénicos repetitivos es una técnica de amplificación por PCR múltiple y definida. Se emplean cebadores consenso dirigidos frente a las secuencias REP, que son secuencias repetidas, altamente conservadas y ampliamente distribuidas a lo largo del genoma bacteriano. Se amplifican las secuencias localizadas entre los motivos REP consecutivos [Grundmann, 1997].

RAPD-PCR y REP-PCR son métodos rápidos, fáciles y baratos. En general, los métodos basados en la PCR no requieren un equipamiento especializado y permiten hacer una estimación rápida de las relaciones epidemiológicas en un lugar concreto, ya sea un hospital o una unidad dentro de un hospital. Pero no son adecuados para estudios epidemiológicos a gran escala, aunque la estandarización y automatización de la REP-PCR ha supuesto una mejora en la reproducibilidad entre laboratorios. El poder de discriminación es inferior al del PFGE.

AFLP es una técnica descrita en el apartado 2.3 de identificación molecular de especies de *Acinetobacter*. Como herramienta epidemiológica es útil para la caracterización de *Acinetobacter* a nivel de subespecie y para la investigación de brotes. Es un método robusto pero requiere un alto nivel de estandarización y amplia experiencia en la interpretación de patrones de bandas, aún cuando se disponga de programas informáticos para su análisis [Janssen, 1996]. Es, por ello,

un método restringido a laboratorios de referencia. Además, los datos no son intercambiables entre laboratorios debido, principalmente, a la falta de reproducibilidad por el empleo de diferentes plataformas de AFLP.

#### 5.4.4. PCR/ESI-MS

Descrito en el apartado 2.9 de identificación molecular de especies de *Acinetobacter*.

#### 5.4.5. PCR múltiplex y secuenciación de genes *ompA*, *csuE* y *bla*<sub>OXA-51-like</sub>

Se analizan las variaciones alélicas de tres genes de factores de virulencia. El gen *ompA* codifica la proteína A de membrana externa que actúa como porina e induce la apoptosis en células epiteliales. El gen *csuE* codifica parte de un sistema de ensamblaje de pilus y es esencial en la formación de biopelículas. Los genes *bla*<sub>OXA-51-like</sub> codifican las carbapenemasas del grupo OXA-51.

La secuenciación génica clasifica los aislados en secuenciogrupos (SGs). Cada SG tiene una combinación característica de alelos de los tres genes. El diseño de dos PCRs múltiplex (PCR1 y PCR2) permite identificar tres SGs principales sin necesidad de secuenciar.

Esta técnica permite tipificar con rapidez las cepas epidémicas que pertenecen a las tres grandes líneas clonales internacionales de *A. baumannii* [Turton, 2007] de la siguiente forma:

- SG1: PCR1 positiva (3 genes), PCR2 negativa, *bla*<sub>OXA-66-like</sub> positivo, clon internacional II.
- SG2: PCR1 negativa, PCR2 positiva (3 genes), *bla*<sub>OXA-69-like</sub> positivo, clon internacional I.
- SG3: PCR1 (*csuE* y *bla*<sub>OXA-51-like</sub> positivos), PCR2 (*ompA* positivo), *bla*<sub>OXA-71-like</sub> positivo, clon internacional III.

#### 5.4.6. PFGE o electroforesis en campo pulsante

Actualmente continúa siendo reconocida como la técnica de referencia para la tipificación epidemiológica de *Acinetobacter* debido a su elevado poder discriminatorio.

La restricción del cromosoma intacto se hace con un enzima de baja frecuencia de corte. Los fragmentos de restricción son de gran tamaño y no pueden resolverse adecuadamente en una electroforesis convencional. El PFGE es una electroforesis especial donde se alterna consecutivamente la dirección del campo eléctrico en un ángulo de 120°. De esta forma y durante varias horas, se separan los distintos fragmentos de restricción. Los perfiles de bandas de ADN obtenidos son analizados visualmente o con programas informáticos

especializados que permiten almacenarlos en una base de datos. La figura 3 muestra los patrones de bandas de varias cepas analizadas por PFGE.

**Figura 3. PFGE de aislados bacterianos de un brote nosocomial**

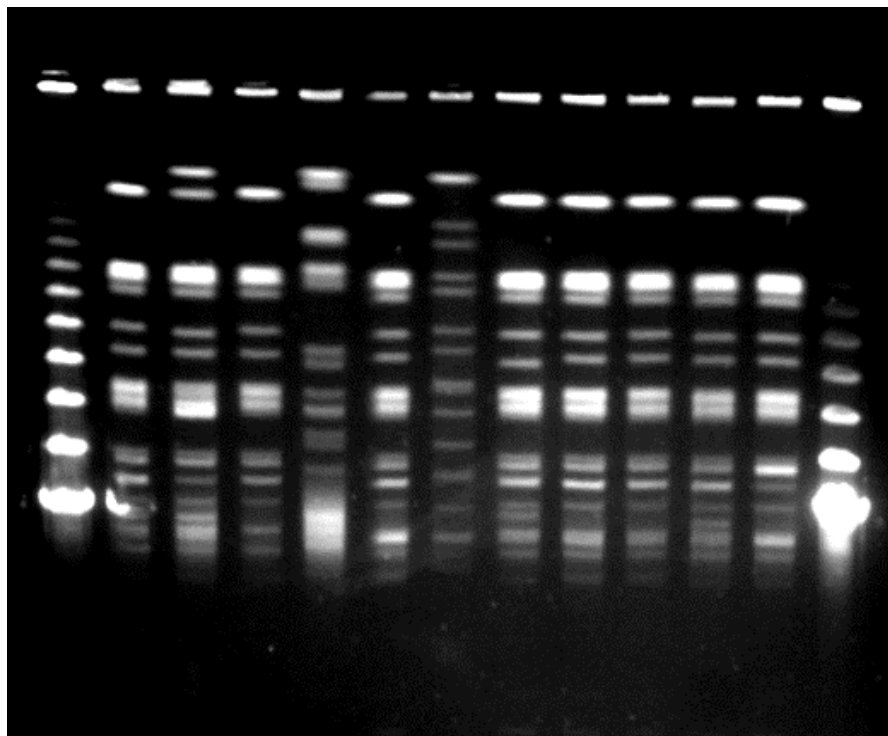


Foto proporcionada por P. Villalón. Lab. Taxonomía. Centro Nac. Microbiología

La estandarización de los protocolos está consiguiendo una buena reproducibilidad entre laboratorios [Seifert, 2005]. Esto está permitiendo el reconocimiento de cepas epidémicas con distribución en diferentes hospitales, incluso implicadas en brotes a nivel nacional. Sin embargo, el poder discriminatorio del PFGE es elevado para estudios de epidemiología a gran escala o de poblaciones.

#### 5.4.7. MLST o tipificación por secuenciación de múltiples loci

Hay dos esquemas validados de MLST para *A. baumannii*, el del Instituto Pasteur [Diancourt, 2010] y el de Oxford [Bartual, 2005]. Ambos consisten en la amplificación por PCR y posterior secuenciación de zonas conservadas de siete genes domésticos. La tabla 4 muestra los genes estudiados en ambos esquemas y las proteínas que codifican.

**Tabla 4. Esquemas MLST de *A. baumannii***

Gen	Proteína	Esquema "Pasteur"	Esquema "Oxford"
<i>cpn60</i>	Chaperonina 60 KDa	Sí	Sí
<i>fusA</i>	Factor de elongación EF-G	Sí	No
<i>gltA</i>	Citrato sintetasa	Sí	Sí
<i>pyrG</i>	CTP sintetasa	Sí	No
<i>recA</i>	Factor de recombinación homólogo	Sí	Sí
<i>rplB</i>	Proteína L2 sub. 50S ribosomal	Sí	No
<i>rpoB</i>	Subunidad $\beta$ ARN polimerasa	Sí	No
<i>gyrB</i>	Subunidad $\beta$ ADN girasa	No	Sí
<i>gdhB</i>	Glucosa deshidrogenasa B	No	Sí
<i>gpi</i>	Glucosa-6-fosfato isomerasa	No	Sí
<i>rpoD</i>	Factor $\sigma$ ARN polimerasa	No	Sí

La secuenciación de los amplificados permite la identificación de diferentes alelos para cada gen. La combinación de alelos de todos los genes estudiados se corresponde con un perfil numérico que se identifica con un secuenciotipo (ST). Existe una base de datos común para los dos esquemas MLST de *A. baumannii* (<http://pubmlst.org/abaumannii>) que permite identificar por comparación los alelos de cada gen, así como la asignación de un ST a un perfil alélico concreto.

Como es un método que adjudica un código numérico a los resultados obtenidos, estos son transferibles entre laboratorios. También es un método caro, laborioso y con un poder discriminatorio inferior al del PFGE. Por tanto, no es aplicable a la rutina en el estudio de brotes y otros estudios epidemiológicos de escala reducida. Su utilidad es como marcador molecular en estudios epidemiológicos de aplicación global o a largo plazo. Permite el reconocimiento de clones epidémicos, multirresistentes y virulentos de *A. baumannii*, así como la monitorización de su dispersión nacional e internacional. Tal es el caso de los tres grandes clones internacionales I, II y III; cada uno de los cuales se corresponde con una serie de STs concretos [Hamouda, 2010; Villalón, 2011].

#### **5.4.8. MLVA o análisis en múltiples loci del número variable de secuencias repetidas en tándem (VNTR)**

El cromosoma bacteriano presenta regiones con secuencias repetidas en tándem en número variable (VNTR). El MLVA consiste en el análisis del número de polimorfismos presentes en varios de estos loci VNTR.

En función de la longitud de la unidad de repetición hay dos tipos de VNTRs, llamados S (small) y L (large). En los microsatélites o S-VNTRs, la unidad de repetición tiene como máximo 9 pb. Los minisatélites o L-VNTRs se caracterizan porque la unidad de repetición es superior a 9 pb. Los esquemas MLVA publicados para las distintas especies bacterianas incluyen marcadores de los dos tipos.

Se amplifican por PCR los marcadores VNTR y posteriormente se separan por EF los fragmentos obtenidos. El tamaño de los fragmentos dependerá del número de repeticiones presentes en cada marcador. El análisis final ofrece un MLVA-tipo que refleja el número de repeticiones para cada marcador estudiado (ej. 7 7 4 9 13 10 20 13).

El esquema MLVA más completo de *A. baumannii* es el conocido como MLVA-8<sub>Orsay</sub> [Pourcel, 2011]; el cual incluye el estudio de ocho loci VNTR, cuatro L-VNTR y cuatro S-VNTR. Los marcadores L son Abaum\_3530, Abaum\_3002, Abaum\_2240 y Abaum\_1988. Los marcadores S son Abaum\_0826, Abaum\_0845, Abaum\_2396 y Abaum\_3468.

El MLVA es una técnica con una elevada reproducibilidad y también posee una elevada capacidad discriminativa. La electroforesis capilar para la separación de los amplificados ofrece la mejor precisión, reproducibilidad y rapidez en el análisis de datos. Por todo ello, es la técnica de referencia en la tipificación epidemiológica de varias especies bacterianas.

# **JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

---



Los brotes nosocomiales causados por cepas multirresistentes de *Acinetobacter baumannii* suponen un problema sanitario de alcance mundial que también afecta a España. El estudio molecular de las cepas ambientales y clínicas aisladas en el ambiente nosocomial es fundamental para entender su epidemiología y por ese motivo, se considera una de las medidas básicas para el control y la prevención de los brotes. Las técnicas de tipificación epidemiológica, como el PFGE y el MLST, son las herramientas empleadas en este tipo de estudios. De esta forma, se han identificado tres grandes clones en los que se agrupan la mayoría de los aislados multirresistentes de *A. baumannii*: los clones internacionales I, II y III.

La mayoría de los estudios epidémicos de *A. baumannii* describen brotes acontecidos en un solo hospital. Para conocer mejor la realidad clonal de los aislados epidémicos de *A. baumannii* en nuestro país, se planteó el estudio de esta bacteria desde un enfoque múltiple que abarcara distintas situaciones epidemiológicas: el estudio a nivel nacional de múltiples brotes nosocomiales, el estudio de un solo brote en un único hospital y el estudio de la población de clones endémicos y epidémicos circulantes en un único hospital.

En este contexto, los objetivos concretos de este trabajo fueron los siguientes:

1. Analizar la diversidad genética y la distribución clonal de las cepas epidémicas de *A. baumannii* aisladas en España durante un periodo de 11

años, empleando las siguientes técnicas de tipificación molecular: PFGE, la secuenciación parcial del gen *rpoB*, y MLST.

2. Comprobar la utilidad taxonómica de la secuenciación parcial del gen *rpoB* en la identificación de la especie *A. baumannii* en una amplia población de cepas epidémicas.
3. Conocer el perfil de resistencia a antimicrobianos de las cepas epidémicas de *A. baumannii* circulantes en España.
4. Determinar la distribución, diversidad y actividad de los genes de las cefalosporinasas derivadas de *Acinetobacter*, de las oxacilinasas hidrolizadoras de carbapenémicos, de las metalo- $\beta$ -lactamasas, y de las secuencias de inserción más comunes relacionadas con esos genes, en la población de clones epidémicos de *A. baumannii* aislados en España.
5. Realizar el análisis epidemiológico de un único brote en una UCI causado por *A. baumannii* extensamente resistente, empleando PFGE como técnica de tipificación molecular.
6. Analizar la diversidad genética y la distribución de los clones endémicos y epidémicos de *A. baumannii* aislados en un solo hospital durante un periodo de 12 años y compararlos con otros clones epidémicos circulantes en España; empleando las siguientes técnicas de tipificación molecular: PFGE, MLST y MLVA.

# **MATERIAL Y MÉTODOS**

## **RESULTADOS**

---



# ARTÍCULO 1

---

**TÍTULO:** “Diversidad clonal de las cepas epidémicas nosocomiales de *Acinetobacter baumannii* en España”

**TITLE:** “Clonal diversity of nosocomial epidemic *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Spain”

Publicado en *Journal of Clinical Microbiology*, año 2011. 49: 875-882

Posición del doctorando: primer autor

© ASM concede a los autores permisos de copia de sus trabajos y también de envío a repositorios institucionales, transcurridos seis meses desde la fecha de su publicación.

LAST UPDATED: November 5, 2009

## ASM Journals Statement of Authors' Rights

### Authors may post their articles to their institutional repositories

ASM grants authors the right to post their accepted manuscripts in publicly accessible electronic repositories maintained by funding agencies, as well as appropriate institutional or subject-based open repositories established by a government or non-commercial entity. Since ASM makes the final, typeset articles from its primary-research journals available free of charge on the ASM Journals and PMC websites 6 months after final publication, ASM recommends that when submitting the accepted manuscript to PMC or institutional repositories, the author specify that the posting release date for the manuscript be no earlier than 6 months after the final publication of the typeset article by ASM.

### Authors may post their articles in full on personal or employer websites

ASM grants the author the right to post his/her article (after publication by ASM) on the author's personal or university-hosted website, but not on any corporate, government, or similar website, without ASM's prior permission, provided that proper credit is given to the original ASM publication.

### Authors may make copies of their articles in full

Corresponding authors are entitled to 10 free downloads of their papers. Additionally, all authors may make up to 99 copies of his/her own work for personal or professional use (including teaching packs that are distributed free of charge within your own institution). For orders of 100 or more copies, you should seek ASM's permission or purchase access through HighWire's Pay-Per-View option, available on the ASM online journal sites.

### Authors may republish/adapt portions of their articles

ASM also grants the authors the right to republish discrete portions of his/her article in any other publication (including print, CD-ROM, and other electronic formats) of which he or she is author or editor, provided that proper credit is given to the original ASM publication. "Proper credit" means either the copyright lines shown on the top of the first page of the PDF version, or "Copyright © American Society for Microbiology, [insert journal name, volume number, year, page numbers and DOI]" of the HTML version. For technical questions about using Rightslink, please contact Customer Support via phone at (877) 622-5543 (toll free) or (478) 777-9929, or e-mail Rightslink customer care at [customerercare@copyright.com](mailto:customerercare@copyright.com).

Please note that the ASM is in full compliance with NIH Policy.

[Back to Top](#) ^

## Clonal Diversity of Nosocomial Epidemic *Acinetobacter baumannii* Strains Isolated in Spain<sup>∇</sup>

Pilar Villalón,<sup>1\*</sup> Sylvia Valdezate,<sup>1</sup> María J. Medina-Pascual,<sup>1</sup> Virginia Rubio,<sup>1</sup>  
Ana Vindel,<sup>2</sup> and Juan A. Saez-Nieto<sup>1</sup>

Laboratorio de Taxonomía<sup>1</sup> and Laboratorio de Infecciones Intrahospitalarias,<sup>2</sup> Servicio de Bacteriología,  
Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain

Received 21 May 2010/Returned for modification 5 August 2010/Accepted 13 December 2010

*Acinetobacter baumannii* is one of the major pathogens involved in nosocomial outbreaks. The clonal diversity of 729 epidemic strains isolated from 19 Spanish hospitals (mainly from intensive care units) was analyzed over an 11-year period. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) identified 58 PFGE types that were subjected to susceptibility testing, *rpoB* gene sequencing, and multilocus sequence typing (MLST). All PFGE types were multidrug resistant; colistin was the only agent to which all pathogens were susceptible. The 58 PFGE types were grouped into 16 clones based on their genetic similarity (cutoff of 80%). These clones were distributed into one major cluster (cluster D), three medium clusters (clusters A, B, and C), and three minor clusters (clusters E, F, and G). The *rpoB* gene sequencing and MLST results reflected a clonal distribution, in agreement with the PFGE results. The MLST sequence types (STs) (and their percent distributions) were as follows: ST-2 (47.5%), ST-3 (5.1%), ST-15 (1.7%), ST-32 (1.7%), ST-79 (13.6%), ST-80 (20.3%), and ST-81 (10.2%). ST-79, ST-80, and ST-81 and the alleles *cpn60-26* and *recA29* are described for the first time. International clones I, II, and III were represented by ST-81, ST-2, and ST-3, respectively. ST-79 and ST-80 could be novel emerging clones. This work confirms PFGE and MLST to be complementary tools in clonality studies. Here PFGE was able to demonstrate the monoclonal pattern of most outbreaks, the inter- and intrahospital transmission of bacteria, and their endemic persistence in some wards. MLST allowed the temporal evolution and spatial distribution of Spanish clones to be monitored and permitted international comparisons to be made.

Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* is a bacterium frequently endemic in certain hospital wards and is responsible for numerous nosocomial outbreaks around the world (3, 23, 33). Its great capacity to survive in low-moisture environments and its ability to develop resistance to antimicrobial agents afford *A. baumannii* the possibility of spreading in hospitals. The skin, oropharynx, and digestive tract are the main body areas colonized in hospitalized patients. The risk of colonization and subsequent infection are associated with factors such as the presence of underlying severe illnesses, long-term hospitalization, stays in specific hospital wards, selective antimicrobial pressure, and invasive interventions such as the use of mechanical ventilation or catheters (4, 12, 14, 18).

Nosocomial outbreaks of *A. baumannii* can have their origin in a single reservoir or in multiple contaminated sites (37, 39), and infection can have serious repercussions for patient morbidity and mortality. Patients can acquire the bacterium from an environmental source or from other patients (6, 18).

The clonal study of hospital strains is very important in terms of an understanding of the epidemiology of these outbreaks. The aim of the present work was therefore to analyze the genetic diversity and clonal distribution of epidemic strains of *A. baumannii* isolated from around Spain over a long period of time. Isolates collected during outbreaks at different hospitals were analyzed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE),

sequencing of the RNA polymerase  $\beta$  subunit (*rpoB*) gene, and multilocus sequence typing (MLST). The results were then compared. Antimicrobial susceptibility testing was also performed to determine the multidrug resistance phenotypes of these epidemic strains.

### MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains.** Over the 11-year period from 1997 to 2007, an initial 814 *A. baumannii* strains isolated from clinical settings and suspected of being involved in nosocomial outbreaks were sent to the Spanish National Center for Microbiology (CNM) for typing. Strains were isolated from 19 public hospitals in 17 Spanish provinces. Hospitals were coded H1 to H19, and provinces were coded P1 to P17. The type of clinical sample, the hospital ward of origin, and the isolation period were registered for all strains (Table 1). Biochemical identification of the strains was undertaken using different commercial systems at the clinical laboratories of origin and was confirmed in our laboratory with Biolog GN2 panels with 95 carbon sources (Biolog, Hayward, CA). For studies based on genetic amplification, DNA was extracted by the boiling method.

**PFGE analysis.** Plug preparation, lysis, cell washing, restriction digestion, and electrophoresis were performed as previously described (32), with slight differences. The entire chromosomal DNA of the strains was digested with 60 U of *Apal* (Takara, Shiga, Japan). PFGE was performed by using a clamped homogeneous electric field electrophoresis (CHEF) DR111 apparatus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). The conditions employed were as follows: temperature of 14°C, voltage of 6 V/cm, run time of 28 h, and switch time of 1 to 35 s. The images obtained were processed by using Quantity One v. 4.6.1 software (Bio-Rad).

A PFGE type was considered epidemic when it was isolated from  $\geq 4$  patients during an outbreak at a hospital. This was reduced to  $\geq 2$  patients for coexisting PFGE types with very closely related profiles. A strain was considered epidemic when it showed an epidemic PFGE type. Thus, 729 epidemic strains were identified among the 814 initial strains studied. In the study of the genetic relationships among the strains, differences in just one band in the PFGE pattern were interpreted as reflecting different PFGE types (34). PFGE clustering was determined by using the unweighted-pair group method with arithmetic averages

\* Corresponding author. Mailing address: Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Ctra. Majadahonda-Pozuelo km 2, 28220 Majadahonda, Madrid, Spain. Phone: 34 91 822 3733. Fax: 34 91 509 7919. E-mail: pvillalon@isciii.es.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 22 December 2010.

TABLE 1. Clinical and epidemiological data for epidemic *A. baumannii* PFGE types

Hospital/province (no. of beds)	No. of clinical samples							Epidemic PFGE type (no. of strains)	Clone	Hospital ward(s) <sup>b</sup>	Isolation period(s) (mo/yr)		
	Respiratory	Wound	Catheter	Urine	Blood	Sterile fluid	Other						
H1/P1 (1,000-1,250)	56	11	14	2	0	0	2	4	0	0	Ab49 (9) Ab50 (68)	D6 ICU D6 ICU	05/2007-12/2007 06/2007-10/2007
H2/P1 (250-500)	15	7	1	5	0	0	2	2	1	0	Ab51 (30)	D6 NI	11/2006-07/2007
H3/P2 (<250)	20	5	1	0	2	1	0	0	0	0	Ab41 (18) Ab39 (2) Ab40 (2) Ab54 (4)	D3 NI D3 NI D3 NI E NI	07/2002-11/2003 08/2002-09/2002 08/2002, 08/2003 08/2003-11/2003, 10/2004
H4/P3 (750-1,000)	32	8	7	5	11	3	8	9	0	0	Ab18 (36) Ab13 (5) Ab29 (4) Ab9 (5) Ab17 (3) Ab11 (2) Ab16 (2) Ab19 (8) Ab10 (14)	B ICU B ICU, IM D1 NI B ICU B ICU B ICU B ICU B ICU, IM B ICU	02/2005-02/2007 03/2005, 02/2006 03/2005 06/2005, 02/2006-02/2007 02/2006 02/2006-06/2006 02/2006-06/2006 02/2006-06/2006 02/2006-02/2007
H5/P3 (250-500)	26	2	11	4	8	0	0	0	0	0	Ab9 (28)	B ICU	07/2005-10/2005, 10/2006, 05/2007
H6/P4 (1,500-1,750)	64	1	0	2	0	0	0	77	2	0	Ab12 (11) Ab14 (3) Ab15 (9)	B ICU B ICU B NI	08/2005-10/2005, 11/2006 09/2005-10/2005 10/2006-12/2006
H7/P5 (250-500)	17	19	0	3	1	0	4	6	1	0	Ab26 (108) Ab27 (27) Ab38 (3) Ab37 (2)	D1 ICU, BU, PSR D1 ICU, BU D3 ICU, PSR D1 BU	03/1999-12/1999, 02/2001 07/1999, 12/1999, 02/2001 06/1999, 02/2001 08/2000
H8/P6 (500-750)	4	0	1	2	1	1	2	12	0	0	Ab43 (4) Ab44 (25) Ab31 (4) Ab7 (4)	D4 ICU D4 NI D1 NI A2 Traumatology	11/1997-04/1998 08/2003-01/2005 11/2003-01/2004 03/2007-06/2007
H9/P7 (750-1,000)	0	0	0	5	0	0	1	0	7	0	Ab8 (5) Ab5 (6) Ab6 (11)	A2 ICU A2 ICU A2 ICU	08/2004-02/2005 08/2004-03/2005 02/2005-03/2005
H10/P8 (1,250-1,500)	7	4	1	0	4	0	0	0	1	0	Ab46 (9)	D5 NI	04/2000-05/2000
H11/P9 (250-500)	12	4	0	1	1	0	0	1	0	0	Ab30 (12)	D2 ICU	09/2003-11/2003
H12/P10 (250-500)	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0	Ab23 (10) Ab24 (6) Ab25 (2)	C ICU C ICU C ICU	10/2001-01/2002 11/2001-01/2002 12/2001
H13/P11 (1,250-1,500)	5	0	1	0	3	0	0	20	0	0	Ab21 (11) Ab20 (24) Ab22 (4)	C NI C ICU C ICU	06/2002 06/1999, 04/2000 06/1999, 04/2000

Hospital	10	2	1	0	4	1	2	2	0	Ab56 (12)	G1	ICU	ICU	12/2000
H14/P12 (250-500)														
H15/P13 (250-500)	3	1	1	0	2	0	2	2	1	Ab28 (7) Ab33 (2) Ab36 (2)	D1 D1 D1	ICU Surgery, ICU PHC	07/1997 07/1997 07/1997	
H16/P14 (250-500)	8	1	2	0	0	1	1	0	0	Ab3 (4) Ab4 (2) Ab1 (2) Ab2 (2)	A1 A1 A1 A1	NI NI NI NI	04/2007-07/2007 05/2007 06/2007 06/2007	
H17/P15 (750-1,000)	3	0	0	1	0	1	3	2	0	Ab55 (10)	F	ICU, PSR, surgery	04/2007	
H18/P16 (250-500)	12	2	1	3	1	1	0	26	6	Ab45 (14) Ab57 (7) Ab42 (2) Ab52 (11) Ab53 (8)	D4 G2 D3 D7 D7	NI NI NI NI ICU	03/2001-07/2001, 05/2002 06/2001-08/2001 11/2001-01/2002 11/2001-05/2002 10/2006	
H19/P17 (1,250-1,500)	22	25	9	11	2	2	5	31	4	Ab34 (46) Ab32 (17) Ab47 (6) Ab48 (19) Ab58 (14) Ab35 (2)	D1 D1 D5 D5 G3 D1	Cardiology, ICU PHC Cardiology Cardiology, ICU Cardiology Traumatology	04/2007-10/2007 05/2007-10/2007 08/2007-10/2007 08/2007-10/2007 08/2007-10/2007 09/2007	

<sup>a</sup> Nasal, axillary, and rectal exudates for *A. baumannii* screening.

<sup>b</sup> ICU, intensive care unit; NI, not informed; IM, internal medicine; BU, burn unit; PSR, postsurgery room; PHC, primary health care.

(UPGMA) and by using Dice's coefficient. The tolerance was set at 0.8%. All calculations were performed by using InfoQuest software (Applied Maths, Saint-Martens-Latem, Belgium).

**Antimicrobial susceptibility.** Antimicrobial susceptibility testing of the different PFGE types was undertaken by using two commercial microdilution methods: Phoenix 100 (Becton Dickinson, Shannon, County Clare, Ireland) and MicroScan NM31 panels (Dade Behring, West Sacramento, CA). The MIC of imipenem was also determined by using the Etest (AB Biodisk, Solna, Sweden). Disk diffusion was used to determine susceptibility to sulbactam (SUL), doxycycline (DOX), minocycline (MIN), tigecycline (TIG), and colistin (COL) (all from Oxoid, Basingstoke, Hants, United Kingdom). Results were interpreted according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) criteria for *Acinetobacter* spp. Owing to the lack of standardization for *A. baumannii*, *Enterobacteriaceae* breakpoints were used for interpreting the results of the tigecycline assays. The control strain used was *Escherichia coli* ATCC 25922.

**rpoB genotyping.** The amplification and sequencing of the 455-bp *rpoB* partial gene were performed for all PFGE types as previously described (20). The *rpoB* gene fragment studied comprises nucleotides 3322 to 3776 in *A. baumannii* type strain ATCC 19606; this was different from the fragment studied by MLST.

**MLST.** In agreement with the MLST instructions provided at the website of the Institute Pasteur ([www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Abaumannii.html](http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Abaumannii.html)), internal fragments of seven housekeeping genes (*cpn60*, *fusA*, *gltA*, *pyrG*, *recA*, *rplB*, and *rpoB*) were amplified and sequenced for each epidemic PFGE type. In the absence of amplification, *rpoB* primers were replaced by *rpoB*+1627 (5'-GGTCCTGGTGGTTAACACG-3') and *rpoB*-2231 (5'-CGAATAACGA TACGAGAAGCA-3') on the basis of type strain ATCC 19606. The PCR amplification conditions were those described previously by Bartual et al. (2). The different alleles for each single locus and the allelic profile-associated sequence types (STs) were assigned an identification number. A concatenated locus alignment was used to analyze genetic relationships (21).

**Sequencing and data analysis.** The purification of the PCR products of the *rpoB* gene and the seven MLST genes was performed by using the QIAamp DNA minikit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). The sequencing of purified fragments was performed with a 3730XL sequencer using the BigDye terminator cycle sequencing kit v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA). The sequences were assembled by using Lasergene SeqMan II software (DNA Star, Inc., Madison, WI). Sequences were aligned and amino acids were deduced by using the ClustalW routine included in the Lasergene MegAlign software package v.6.1 (DNA Star, Inc.). MLST similarities between allelic profiles were sought by UPGMA using MEGA v. 4 software (K. Tamura, J. Dudley, M. Nei, and S. Kumar, 2007). MLST polymorphic analysis was performed by using DnaSP v. 5.10 software ([www.ub.edu/dnasp/](http://www.ub.edu/dnasp/)).

**Nucleotide sequence accession numbers.** The three newly identified *rpoB* gene sequences detected were assigned GenBank accession numbers GU942482 to GU942483 and GU942485; the newly identified alleles *cpn60-26* and *recA29* were assigned accession numbers GU942486 and GU942487, respectively.

## RESULTS

**Bacterial strains.** The clinical distribution of the 814 strains was as follows: respiratory tract, 38.8%; nasal, axillary, and rectal samples (from colonization screenings), 23.8%; wounds, 11.3%; catheter tips, 6.3%; urine, 5.4%; blood, 4.9%; sterile fluid, 1.4%; other locations, 3.9%; and not informed, 4.2%. The mean number of strains sent from hospitals was 42.8 (range, 10 to 146). These strains were collected mainly from patients hospitalized in intensive care units (Table 1).

**PFGE analysis.** Fifty-eight epidemic PFGE types were detected among the 729 epidemic strains and were coded Ab1 to Ab58. The discriminatory power of the technique was expressed via the Simpson diversity index (DI), which showed a value of 0.95 (16).

Table 1 shows the distribution of the PFGE types in the different hospitals (number of strains, hospital wards, and isolation period for each PFGE type). The mean number of PFGE types detected in the studied hospitals was 3 (range, 1 to 9).

Figure 1 shows the clustering of the PFGE types and the hospitals of origin. For all the PFGE types detected, the ge-

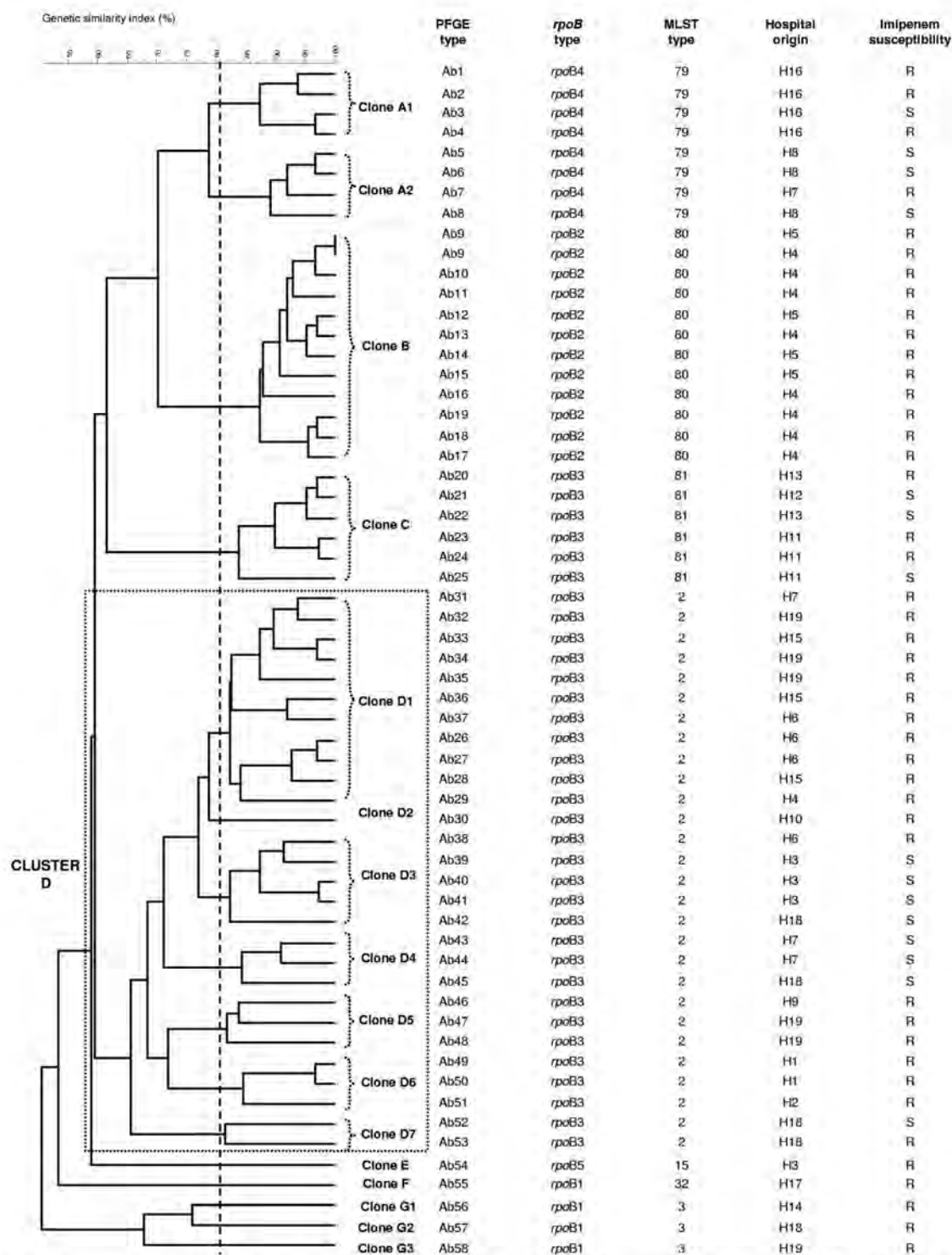


FIG. 1. Dendrogram showing the genetic diversity of *A. baumannii* strains determined by PFGE, *rpoB* gene sequencing, and MLST; the hospital distribution; and the susceptibility to imipenem. The broken line corresponds to the cutoff level (80%) used to define single PFGE clones. Dotted squares mark the boundaries of cluster D. R, resistant; S, susceptible.

netic similarity coefficient ranged from 50% to 100%; PFGE types were considered to represent the same clones when the genetic similarity was >80% (35, 36, 38). Clone A (clones A1 and A2), B, and C grouped 8, 11, and 6 PFGE types, respec-

tively, with genetic similarity ranges of 87 to 97%, 87 to 100%, and 83 to 97%, respectively. For clone B, Ab9 was shared by two different epidemic strains from hospitals H4 and H5. Cluster D grouped 28 PFGE types, containing seven clones (clones

TABLE 2. *rpoB* types of the Spanish *A. baumannii* epidemic strains

<i>rpoB</i> type	Nucleotide and change at position <sup>a</sup> :						No. of positive isolates/total no. of isolates (%)	GenBank accession no.	Reference
	3523	3577	3591	3649	3678	3700			
<i>rpoB1</i>	C	A	G	C	G	C	4/59 (6.8)	DQ207471	20
<i>rpoB2</i>	—	—	<b>T</b>	—	—	—	12/59 (20.3)	GU942482	This study
<i>rpoB3</i>	—	—	—	—	<b>T</b>	—	34/59 (57.6)	CP000863	17
<i>rpoB4</i>	<b>T</b>	—	—	—	<b>T</b>	—	8/59 (13.6)	GU942483	This study
<i>rpoB5</i>	—	—	—	<b>T</b>	—	<b>T</b>	1/59 (1.7)	GU942485	This study

<sup>a</sup> With reference to the *rpoB1* sequence, which corresponds to *A. baumannii* ATCC 19606. Changes are shown in boldface type. —, no changes.

D1 to D7), and the genetic similarity coefficient ranged from 65 to 97%. Clones E, F, and G1 to G3 showed a greater genetic variability among one another than the other clones (50 to 76%).

**Antimicrobial susceptibility.** Isolates of all PFGE types had a multiple-antimicrobial-resistant phenotype. All isolates were fully resistant to ticarcillin, piperacillin, piperacillin-tazobactam, aztreonam, cefotaxime, ceftazidime, gentamicin, ciprofloxacin, and trimethoprim-sulfamethoxazole. The rates of susceptibility to other antimicrobials were 20.3% for sulbactam (SUL), 1.7% for cefepime, 25.4% for imipenem (the clonal distribution is shown in Fig. 1), 6.8% for meropenem, 10.2% for amikacin, 5.1% for tobramycin, 55.9% for minocycline (MIN), 49.2% for doxycycline (DOX), and 1.7% for tigecycline (TIG). All of the strains were susceptible to colistin (COL). Two main phenotypes were observed: COL susceptible (32.2% of the epidemic PFGE types) and DOX-MIN-COL susceptible (33.9%). Others phenotypes detected included SUL-COL (10.2%), SUL-DOX-MIN-COL (10.2%), MIN-COL (6.8%), and DOX-MIN-TIG-COL (1.7%) susceptible.

***rpoB* genotyping.** The taxonomic identification of the epidemic strains was confirmed by *rpoB* gene sequencing. Five different *rpoB* genotypes were obtained among 59 PFGE types, with a Simpson DI of 0.6. By extrapolating these results (the same PFGE type corresponds to the same *rpoB* gene) to the 729 epidemic strains, the DI was 0.45. The maximum genetic divergence rate was 0.88%. The *rpoB1* sequence was identical to that of reference strain *A. baumannii* ATCC 19606. *rpoB3* was the most common sequence (57.6%). *rpoB2*, *rpoB4*, and *rpoB5* are reported here for the first time. A total of five mutations were detected, all of them silent (Table 2). Figure 1 shows the clonal distribution of the *rpoB* types. *rpoB1* appeared in clones F and G1 to G3, *rpoB2* appeared in clone B, *rpoB3* appeared in clones C and D1 to D7, *rpoB4* appeared in clones A1 and A2, and *rpoB5* appeared in clone E.

**MLST.** Seven different STs were identified among 59 PFGE types, with a Simpson DI of 0.7. By extrapolating these results (the same PFGE type corresponds to the same ST) to the 729 epidemic strains, the DI was 0.48. The number of alleles and polymorphic sites identified for each locus were 5 and 7, respectively, for *cpn60*; 4 and 3 for *fusA*, respectively; 4 and 3 for *gltA*, respectively; 2 and 1 for *pyrG*, respectively; 5 and 7 for *recA*, respectively; 4 and 3 for *rplB*, respectively; and 4 and 3 for *rpoB*, respectively. Two newly identified alleles were described and designated *cpn60-26* (69-T→A) and *recA29* (252-T→C); the *cpn60-1* and *recA3* alleles are the respective reference sequences. A total of 27 polymorphic sites were detected in the concatenated alignment. The maximum ge-

netic divergence rate between STs was 0.57%. Except for the *fusA6* allele, which showed a change in the amino acid sequence, 202-Gly(GGT)→Ser(AGT), all nucleotide changes detected were silent.

The different STs identified were ST-2, ST-3, ST-15, ST-32, ST-79, ST-80, and ST-81. ST-81, ST-2, and ST-3 correspond to international clonal complex 1, clone II, and clone III, respectively (9). ST-79, ST-80, and ST-81 are described here for the first time. ST-79 had two newly identified alleles, *cpn60-26* and *recA29*. For ST-80 and ST-81, the novelty was not any new allele but a new combination of the previously described alleles of the seven housekeeping genes. These newly identified alleles and STs were codified by the Institut Pasteur's MLST *A. baumannii* working group.

The clonal distribution of the STs was as follows (Fig. 1): ST-2 (47.5%) in clones D1 to D7, ST-3 (5.1%) in clones G1 to G3, ST-15 (1.7%) in clone E, ST-32 (1.7%) in clone F, ST-79 (13.6%) in clones A1 and A2, ST-80 (20.3%) in clone B, and ST-81 (10.2%) in clone C. The temporal and geographical distributions of Spanish clones are shown in Fig. 2.

## DISCUSSION

Multidrug-resistant *A. baumannii* is one of the major pathogens involved in nosocomial outbreaks. Most of the 814 *A. baumannii* strains sent to the CNM for clonal study came from hospital wards where critical care was provided, such as burn units, postsurgical units, and, in particular, intensive care units (12). The majority of isolates came from respiratory samples, as reported previously for similar studies (Table 1). Critically ill patients have many risk factors that leave them particularly vulnerable to *A. baumannii* infection (4). Indeed, certain invasive life-maintaining interventions, such as respiratory intubation, provide an entry route for many nosocomial pathogens, including *A. baumannii*.

Multidrug-resistant patterns are common in *A. baumannii* nosocomial outbreaks (13, 40). Susceptibility testing of the 58 epidemic PFGE types showed a widespread multidrug-resistant phenotype. All strains were resistant to at least four different antimicrobial groups with known therapeutic activity against *A. baumannii*. The intermediate MICs and halo diameter values obtained were also considered to reflect resistance. The first choice for the treatment of multidrug-resistant *A. baumannii* infection is colistin. This organism shows a very low level of resistance to this agent; indeed, in the present study, full susceptibility was seen.

As for many other bacterial species, PFGE is considered the most discriminatory typing method for *A. baumannii* (16, 25,

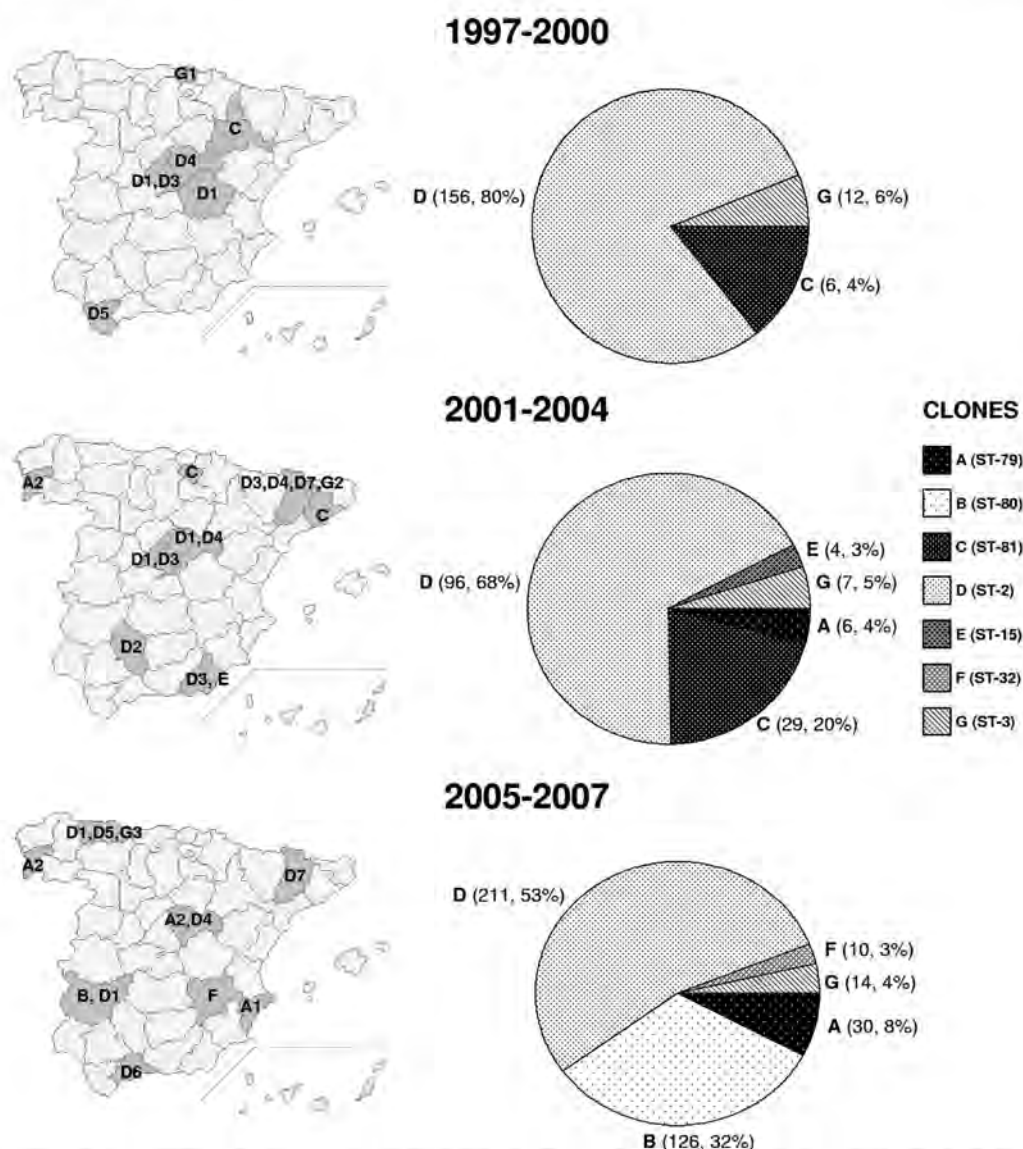


FIG. 2. Spanish *A. baumannii* clones in three time periods. Left maps illustrate its provincial distribution. Right pie charts show the numbers of strains isolated and the global percentage for each clone. (Adapted from a map available at <http://www.xtec.net> under a Creative Commons license.)

31). In the present study, the high Simpson DI (0.95) showed PFGE to be an efficient tool for determining the genetic relationship between strains isolated in epidemic outbreaks. It was also useful for determining the involvement of the strains in different epidemiological situations (36).

The hospital clonal distribution of the PFGE types revealed two outbreak models: monoclonal and polyclonal (Table 1 and Fig. 1). The monoclonal model was the most common, appearing in 15 out of 19 hospitals. These monoclonal outbreaks were caused by either one epidemic PFGE type (six hospitals) or more than one PFGE type (eight hospitals). In the latter case, one PFGE type usually prevailed over the others. Hospital H7 was affected by different clones that caused four independent monoclonal outbreaks at different times. The polyclonal model

affected only four hospitals (H3, H4, H18, and H19). For hospitals H3 and H4, one of the coexisting clones was clearly in the minority. This might reflect the coexistence of sporadic and epidemic clones (30). Hospital H19 had three clones (clones D1, D5, and G3) isolated from the cardiology ward, which might reflect a low level of nosocomial infection control in this unit. This hospital showed a polyclonal pattern (unfortunately, the origin of the outbreak was unknown) plus the intrahospital dissemination of some clones (clones D1 and D5) by a suspected cross-contamination mechanism (24). Hospital H18 showed a polyclonal outbreak with coexisting epidemic and sporadic clones, but in the absence of sufficient information no epidemiological analysis was possible.

The time distribution of the 58 PFGE types showed all of

them to be involved in epidemic outbreaks, although some showed long-term persistence in some hospital wards. In hospital H7, clone D4 was detected over two separate periods of 6 and 17 months. In hospital H18, clone D7 was isolated in two different outbreaks in 2001 and 2006. The reappearance of previously isolated clones in these two hospitals reveals the endemic persistence of *A. baumannii* strains in the nosocomial environment, where they represent a risk factor for future outbreaks.

The interhospital transmission of *A. baumannii* is known to be possible (1, 5, 22). The present study reflects the time distribution of the PFGE types in clones B and D6. Clone B was exclusive to hospitals H4 and H5, both in the same Spanish province, province P3. The genetic similarity of the PFGE types was very high (87 to 100%), with both hospitals sharing type Ab9. This PFGE type was detected for the first time in hospital H4 in June 2005 as a minority type. In hospital H5, type Ab9 was detected in July 2005, the first and major PFGE type isolated in this hospital (26). These data point to the transmission of type Ab9 from hospital H4 to hospital H5, originating a new outbreak in the latter hospital. An unconfirmed explanation for this could be the transfer of patients and/or health care workers from one hospital to another; such an exchange would be favored by their belonging to the same public health area. In hospitals H1 and H2, clone D6 also showed a provincial distribution (province P1) for PFGE types Ab49, Ab50, and Ab51. Although these hospitals share no common PFGE type, an interhospital transmission of the bacteria may still have occurred.

*rpoB* gene sequencing was tested as a means of obtaining a screening marker that could offer more rapid results for outbreak analysis. The *rpoB* types showed a clonal distribution correlated with the PFGE types (one clone corresponding to one *rpoB* type). Conventional biochemical tests are not able to identify *A. baumannii* with 100% accuracy. In most cases, they are able to assign bacteria only to the *Acinetobacter baumannii*-*A. calcoaceticus* complex. In this context, the partial sequencing of the *rpoB* gene is a useful tool for identifying bacteria to the species level (19, 20). All the present PFGE types were identified as being *A. baumannii* types by using this technique.

MLST analysis of the epidemic strains returned seven STs (Fig. 1) with a clonal distribution that correlated with the PFGE types (one clone correlated with one ST). The international clonal relationships were made according to an analysis described previously by Diancourt et al. (9). ST-2 corresponds to international clone II. It has been described as being the most common ST in Mediterranean countries (7, 11, 15) and was the most prevalent ST in the present study (47.5%). ST-2 was shared by all clones of cluster D (clones D1 to D7), which were widely distributed across the Spanish provinces examined during the period of 1997 to 2007, accounting for more than 50% of isolates (Fig. 2). ST-3 (5.1%) corresponds to international clone III and appeared in cluster G (clones G1 to G3). The cluster G clones, although minority clones, had a sporadic time distribution throughout the study period (detected in 2000, 2001, and 2007) and showed a random geographical distribution. ST-15 (1.7%) and ST-32 (1.7%) had limited temporal and geographic distributions.

ST-79, ST-80, and ST-81 are described here for the first

time. ST-81 (10.2%) differed from ST-1 by a single allele; it was therefore included in clonal complex 1, which comprises international clone I. ST-81 was shared by clone C and had a significant number of isolates in 1999 to 2002 in the northeast of Spain, but since then, it has never again been detected. ST-79 (13.6%) had two newly described alleles (*cpn60-26* and *recA29*) detected in the cluster A clones (clones A1 and A2). The cluster A clones were first isolated in province P6 in 2004 as minority clones. Since 2005, the number of isolations of cluster A clones has increased, spreading to other provinces. ST-80 (20.3%), a new combination of previously described alleles, was shared by clone B isolates. It was detected only in province P3 in 2005 to 2007 and was implicated in the interhospital transmission of *A. baumannii* (from hospital H4 to hospital H5). ST-79 and ST-80 might be novel emerging clones in an expansion process. Both STs should be monitored by MLST to determine their evolution.

International clonal complex 1 (ST-81), clone II (ST-2), and clone III (ST-3) have been repeatedly associated with multidrug-resistant isolates (10, 11, 15, 27, 38). The imipenem-susceptible isolates showed no homogeneous distribution; rather, they showed a biased distribution in cluster A (ST-79), clone C (ST-81), and clones D3, D4, and D7 (all of them of ST-2) (Fig. 1). The ST imipenem susceptibility results fit well with previously reported data (9) for ST-2 (susceptible and resistant strains) and for ST-15 (only resistant strains). ST-3, ST-32, and ST-81, previously described as being imipenem susceptible (9), were resistant in the present work. ST-79 and ST-80 are described for the first time in this study; thus, no previous data are available for comparison.

The study of the genetic variability of *A. baumannii* strains provides much in-depth knowledge regarding their epidemiology. Many hospitals have included this kind of analysis among the measures taken to eradicate outbreaks (8, 15, 26, 29). This work shows that typing studies provide information about time-clonal distribution in different hospital wards and the clonal complexity of outbreaks. The results confirm that a clone can reappear at different times, suggesting that endemic persistence occurs. The results also highlight the intra- and internosocomial transmission of bacteria, reflecting how multidrug-resistant *A. baumannii* has become a hospital problem worldwide.

In conclusion, the present work shows PFGE and MLST to be concordant and complementary tools when used in clonality studies. PFGE offers exhaustive information for outbreak studies, which is useful in local settings and even in nationwide comparisons (28). MLST is a portable typing method (21) that allows interlaboratory comparisons and the large-scale monitoring of the growing list of national and international epidemic clones involved in nosocomial outbreaks (9, 10, 11, 15, 28, 38).

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank the clinical microbiologists involved in the isolation and submission of the *A. baumannii* strains to the Taxonomy Laboratory at the CNM, the Genotyping of Pathogens and Public Health (Institut Pasteur) platform for coding the MLST alleles and profiles, and Adrian Burton for revision of the English manuscript.

This work was partially funded by the Instituto de Salud Carlos III (MPY 1116/07).

REFERENCES

1. Barbolla, R. E., D. Centron, and M. A. Di. et al. 2003. Identification of an epidemic carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strain at hospitals in Buenos Aires City. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **45**:261–264.
2. Bartnal, S., et al. 2005. Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* **43**:4382–4390.
3. Bergogne-Bérézin, E., and K.-J. Towner. 1996. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin. Microbiol. Rev.* **9**:148–165.
4. Cisneros, J. M., et al. 2005. Risk-factors for the acquisition of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Spain: a nationwide study. *Clin. Microbiol. Infect.* **11**:874–879.
5. Coelho, J. M., J. F. Turton, and M. E. Kanfmann. 2006. Occurrence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clones at multiple hospitals in London and Southeast England. *J. Clin. Microbiol.* **44**:3623–3627.
6. D'Agata, E., V. Thayer, and W. Schaffner. 2000. An outbreak of *Acinetobacter baumannii*: the importance of cross-transmission. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **21**:588–591.
7. Da Silva, G., L. Dijkshoorn, T. van der Reijden, B. van Strijen, and A. Dnarte. 2006. Identification of widespread, closely related *Acinetobacter baumannii* isolates in Portugal as a subgroup of European clone II. *Clin. Microbiol. Infect.* **13**:190–195.
8. Denton, M., et al. 2009. Role of environmental cleaning in controlling an outbreak of *Acinetobacter baumannii* on a neurosurgical intensive care unit. *J. Hosp. Infect.* **56**:106–110.
9. Diancourt, L., V. Passet, A. Nemeč, L. Dijkshoorn, and S. Brisse. 2010. The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PLoS One* **5**:e10034.
10. Dijkshoorn, L., et al. 1996. Comparison of outbreak and nonoutbreak *Acinetobacter baumannii* strains by genotypic and phenotypic methods. *J. Clin. Microbiol.* **34**:1519–1525.
11. Di Popolo, A., M. Giannoni, M. Triasi, S. Brisse, and R. Zarrilli. 2010. Molecular epidemiological investigation of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in four Mediterranean countries with a multilocus sequence typing scheme. *Clin. Microbiol. Infect.* [Epub ahead of print.] doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03254.x.
12. Falagas, M. E., and E. A. Karveli. 2007. The changing global epidemiology of *Acinetobacter baumannii* infections: a development with major public health implications. *Clin. Microbiol. Infect.* **13**:117–119.
13. Fierobe, L., et al. 2001. An outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in critically ill surgical patients. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **22**:35–40.
14. Fournier, P. E., and H. Richet. 2006. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clin. Infect. Dis.* **42**:692–699.
15. Giannouli, M., et al. 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.
16. Hunter, P. R., and M. A. Gaston. 1998. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* **26**:2465–2466.
17. Iacono, M., et al. 2008. Whole-genome pyrosequencing of an epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain belonging to the European clone II group. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:2616–2625.
18. Katragkou, A., et al. 2006. Acquisition of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a pediatric intensive care unit: a case-control study. *Intensive Care Med.* **32**:1384–1391.
19. Ko, K. S., et al. 2007. High rates of resistance to colistin and polymyxin B in subgroups of *Acinetobacter baumannii* isolates from Korea. *J. Antimicrob. Chemother.* **60**:1163–1167.
20. La Scola, B., V. Gundi, A. Khamis, and D. Raoult. 2006. Sequencing of the *rpoB* gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter* species. *J. Clin. Microbiol.* **44**:827–832.
21. Maiden, M. 2006. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **60**:561–588.
22. Manikal, V. M., et al. 2000. Endemic carbapenem-resistant *Acinetobacter* species in Brooklyn, New York: citywide prevalence, interinstitutional spread, and relation to antibiotic usage. *Clin. Infect. Dis.* **31**:101–106.
23. Maragakis, L., and T. Perl. 2008. *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. *Clin. Infect. Dis.* **46**:1254–1263.
24. Marchaim, D., et al. 2007. Molecular and epidemiology study of polyclonal outbreaks of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection in an Israeli hospital. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **28**:945–950.
25. Marcos, M. A., et al. 1994. Epidemiological markers of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from a spinal cord injury unit. *J. Hosp. Infect.* **28**:39–48.
26. Monterrubio-Villar, J., et al. 2009. Outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* in a polyvalent intensive care unit: clinical, epidemiological analysis and PFGE-printing evolution. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **28**:1281–1284.
27. Nemeč, A., L. Dijkshoorn, and T. J. van der Reijden. 2004. Long-term predominance of two pan-European clones among multi-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in the Czech Republic. *J. Med. Microbiol.* **53**:147–153.
28. Peleg, A. Y., H. Seifert, and D. L. Paterson. 2008. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* **21**:538–582.
29. Roberts, S. A., R. Findlay, and D. R. Lang. 2001. Investigation of an outbreak of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* in an intensive care burns unit. *J. Hosp. Infect.* **48**:228–232.
30. Rodríguez-Baño, J., et al. 2004. Clinical features and epidemiology of *Acinetobacter baumannii* colonization and infection in Spanish hospitals. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **25**:819–824.
31. Seifert, H., and P. Gerner-Smidt. 1995. Comparison of ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Acinetobacter* isolates. *J. Clin. Microbiol.* **33**:1402–1407.
32. Seifert, H., et al. 2005. Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* **43**:4328–4335.
33. Sonli, M., I. Galani, and H. Giamarellon. 2008. Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. *Euro Surveill.* **13**(47):pii=19045. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19045>.
34. Tenover, F. C., et al. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* **33**:2233–2239.
35. Turton, J. F., et al. 2004. A prevalent, multiresistant clone of *Acinetobacter baumannii* in Southeast England. *J. Hosp. Infect.* **58**:170–179.
36. van Belkum, A., et al. 2007. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **13**:1–46.
37. van der Broek, P. J., et al. 2006. Epidemiology of multiple *Acinetobacter* outbreaks in the Netherlands during the period 1999–2001. *Clin. Microbiol. Infect.* **12**:837–843.
38. van Dessel, H., et al. 2004. Identification of a new geographically widespread multiresistant *Acinetobacter baumannii* clone from European hospitals. *Res. Microbiol.* **155**:105–112.
39. Villegas, M. V., and A. I. Harstein. 2003. *Acinetobacter* outbreaks, 1977–2000. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **24**:284–295.
40. Wang, S. H., et al. 2003. Healthcare-associated outbreak due to pan-drug resistant *Acinetobacter baumannii* in a surgical intensive care unit. *J. Hosp. Infect.* **53**:97–102.

## ARTÍCULO 2

---

**TÍTULO:** “Epidemiología de los genes de las cefalosporinas derivadas de *Acinetobacter*, las oxacilinasas hidrolizadoras de carbapenémicos y las metalo- $\beta$ -lactamasas, y de las secuencias de inserción comunes en los clones epidémicos de *Acinetobacter baumannii* en España”

**TITLE:** “Epidemiology of the *Acinetobacter*-derived cephalosporinase, carbapenem-hydrolysing oxacillinase and metallo- $\beta$ -lactamase genes, and of common insertion sequences, in epidemic clones of *Acinetobacter baumannii* from Spain”

Publicado en *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, año 2012. 68: 550-553

Posición del doctorando: primer autor

© Oxford University Press concede a los autores permisos de copia de sus trabajos y también de envío a repositorios institucionales, transcurridos doce meses desde la fecha de su publicación.



**Author Self-Archiving Policy**

[Return to Rights & Permissions](#)

## Author Self-Archiving Policy

### Author's Original Version

The author's original version is defined here as the un-referenced author version of an article that is considered by the author to be of sufficient quality to be submitted for formal peer review by a second party. The author accepts full responsibility for the article, which may have a version number or date stamp and the content and layout is set out by the author.

Prior to acceptance for publication in the journal, authors retain the right to make their original version of the article available on their own personal website and/or that of their employer and/or in free public servers of original version articles in their subject area, provided that, upon acceptance, they acknowledge that the article has been accepted for publication as follows:

*This article has been accepted for publication in [Journal Title] Published by Oxford University Press.*

Once an article is accepted for publication, an author may not make the version of record available in this way or replace their original version with the **accepted manuscript** or **version of record**.

### Accepted Manuscript

The accepted manuscript is defined here as the final draft author manuscript, as accepted for publication by a journal, including modifications based on referees' suggestions, before it has undergone copyediting and proof correction.

Authors may upload their accepted manuscript PDF to an institutional and/or centrally organized repository, provided that public availability is delayed until **12 months after first online publication** in the journal.

When uploading an accepted manuscript to a repository, authors should include the following acknowledgment as well as a link to the version of record. This will guarantee that the version of record is readily available to those accessing the article from public repositories, and means that the article is more likely to be cited correctly.

*This is a pre-copyedited, author-produced PDF of an article accepted for publication in [insert journal title] following peer review. The version of record [insert complete citation information here] is available online at: xxxxxxx [insert URL that the author will receive upon publication here].*

### Version of Record

The version of record is defined here as a fixed version of the journal article that has been made available by OUP by formally and exclusively declaring the article "published". This includes any "early release" article that is formally identified as being published even before the compilation of a volume issue and assignment of associated metadata, as long as it is citable via some permanent identifier(s). This does not include any "early release" article that has not yet been "fixed" by processes that are still to be applied, such as copy-editing, proof corrections, layout, and typesetting.

A PDF of the version of record as it appears in the journal following copyediting and proof correction **may not** be deposited by authors in institutional repositories unless the article is published under the *Oxford Open* model.

### Policy for Oxford Open articles only

Authors of *Oxford Open* articles are entitled to deposit their accepted manuscript **or the version of record** in institutional and/or centrally organized repositories and can make this publicly available immediately upon publication, provided that the journal and OUP are attributed as the original place of publication and that correct citation details are given. Authors should also deposit the URL of their published article, in addition to the PDF version.

**The journal strongly encourages *Oxford Open* authors to deposit the version of record instead of the accepted manuscript.** This will guarantee that the definitive version is readily available to those accessing your article from such repositories, and means that your article is more likely to be cited correctly.

Oxford Journals automatically deposits open access articles in PMC for the majority of journals participating in *Oxford Open*. For a list of journals involved and for the latest information on the status of PMC deposits for individual journals please see [journals which offer an open access model](#).

In case of query please contact [Journals Permissions](#)

Connect



[RSS](#)

[eAlerts](#)

[About Us](#)  
[Careers](#)  
[Contact Us](#)

**Gateways**  
[Oxford Academic](#)  
[Books & Online Resources](#)

**Subjects**  
[Arts & Humanities](#)  
[Law](#)

**Resources**  
[Agents](#)  
[Authors](#)

**Customer Services**  
[Contact Us](#)  
[Help](#)

*Oxford University Press*  
*is a department of the*  
*University of Oxford, UK*

<a href="#">Connect</a> <a href="#">News</a> <a href="#">Oxford Open</a>	<a href="#">Oxford English Dictionary</a> <a href="#">Oxford Dictionaries</a>  <a href="#">Oxford Index</a>  <a href="#">OUP Worldwide</a> <a href="#">University of Oxford</a>	<a href="#">Medicine &amp; Health Science &amp; Mathematics</a> <a href="#">Social Sciences</a>  <a href="#">Journals A-Z</a>	<a href="#">Librarians</a> <a href="#">Personal Subscribers</a> <a href="#">Press &amp; Media</a> <a href="#">Societies</a> <a href="#">Sponsors &amp; Advertisers</a>	<a href="#">Frequently Asked Questions</a> <a href="#">Access &amp; Purchase</a> <a href="#">Pricing &amp; Ordering</a> <a href="#">Dispatch Dates</a>	<i>furthers the University's objective of excellence in research, scholarship, and education by publishing worldwide.</i>  <b>OXFORD</b> UNIVERSITY PRESS
--------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Copyright © Oxford University Press 2015

[Privacy Policy](#) | [Cookie Policy](#) | [Legal Notice](#) | [Site Map](#) | [Accessibility](#)

## Epidemiology of the *Acinetobacter*-derived cephalosporinase, carbapenem-hydrolysing oxacillinase and metallo- $\beta$ -lactamase genes, and of common insertion sequences, in epidemic clones of *Acinetobacter baumannii* from Spain

Pilar Villalón<sup>1\*</sup>, Sylvia Valdezate<sup>1</sup>, Maria J. Medina-Pascual<sup>1</sup>, Gema Carrasco<sup>1</sup>, Ana Vindel<sup>2</sup> and Juan A. Saez-Nieto<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Taxonomía, Servicio de Bacteriología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain; <sup>2</sup>Laboratorio de Infecciones Intrahospitalarias, Servicio de Bacteriología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain

\*Corresponding author. Tel: +34-91-822-3733; Fax: +34-91-509-7919; E-mail: pvillalon@isciii.es

Received 7 June 2012; returned 1 August 2012; revised 27 September 2012; accepted 12 October 2012

**Objectives:** To study the distribution, diversity and activity of *Acinetobacter*-derived cephalosporinase (ADC)-, carbapenem-hydrolysing oxacillinase (CHO)- and metallo- $\beta$ -lactamase (MBL)-encoding genes, and of the most common insertion sequences (ISs), in the genome of nosocomial, epidemic, multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* (MDRAB) clones from Spain.

**Methods:** The studied population included 59 MDRAB strains previously genotyped by PFGE and multilocus sequence typing. The search for the ADC (*bla*<sub>ADC</sub>), CHO (*bla*<sub>OXA-51-like</sub>, *bla*<sub>OXA-23-like</sub>, *bla*<sub>OXA-40-like</sub> and *bla*<sub>OXA-58-like</sub>) and MBL (*bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>SIM-1</sub>, *bla*<sub>GIM-1</sub>, *bla*<sub>SPM-1</sub> and *bla*<sub>NDM-1</sub>) genes, and for the ISs (ISAb<sub>1</sub>, ISAb<sub>2</sub>, ISAb<sub>3</sub>, ISAb<sub>4</sub> and IS18) was done by PCR assays. The phenotypic presence of MBL enzymes was examined using imipenem/imipenem+EDTA strips.

**Results:** The most prevalent IS, ISAb<sub>1</sub> (93.2%), was detected upstream of *bla*<sub>ADC</sub> and *bla*<sub>OXA-51-like</sub>. These genes showed ample diversity (10 and 8 alleles, respectively). Four ADC sequences (ADC-1-like<sub>P240S</sub>, ADC-2-like<sub>N260H/T264N</sub>, ADC-11-like<sub>Q163K</sub> and ADC-11-like<sub>G362R</sub>) are described here for the first time. *bla*<sub>OXA-58-like</sub> was carried by 20.3% of strains, in association with ISAb<sub>2</sub>, ISAb<sub>3</sub> or IS18. *bla*<sub>OXA-40-like</sub> was the most prevalent acquired CHO gene (57.6%), and was associated with none of the studied ISs. Neither *bla*<sub>OXA-23-like</sub> nor ISAb<sub>4</sub> was detected in any strain. Some 67.8% of strains with MBL activity showed no corresponding gene in PCR; these results were more common in strains with a highly active CHO, such as OXA-40.

**Conclusions:** All the studied genes and their related ISs showed a clonal distribution. Imipenem resistance was probably provided by OXA-40 for the most part, while MBL- and OXA-23-encoding genes were absent in the studied population.

**Keywords:** multidrug resistance,  $\beta$ -lactamases, carbapenemases, imipenem

### Introduction

Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* (MDRAB) is one of the main pathogens involved in outbreaks in hospitals.<sup>1</sup> Carbapenems are the first choice in the treatment of severe *A. baumannii* infections. The study of resistance to this group of antimicrobials is therefore essential if we are to continue to successfully treat infected patients.

The production of  $\beta$ -lactamases is a mechanism of resistance to  $\beta$ -lactams of particular importance. Unfortunately a wide range of

$\beta$ -lactamases has now been detected in *A. baumannii*, including intrinsic *Acinetobacter*-derived cephalosporinases (ADCs), main carbapenem-hydrolysing oxacillinases (CHOs; OXA-51, OXA-23, OXA-40 and OXA-58) and metallo- $\beta$ -lactamases (MBLs).<sup>1–4</sup> The transcription of these  $\beta$ -lactamase genes is enhanced by different insertion sequences (ISs) located in their proximity. The ISs most commonly associated with the carbapenemase genes in MDRAB are ISAb<sub>1</sub>, ISAb<sub>2</sub>, ISAb<sub>3</sub>, ISAb<sub>4</sub> and IS18.<sup>5</sup>

The aim of the present work was to determine the distribution, diversity and activity of the most important  $\beta$ -lactamase

genes, and their related ISs, in a well-characterized population of nosocomial, epidemic MDRAB clones from Spain.<sup>6</sup>

## Materials and methods

### Bacterial strains

This work examined 59 MDRAB strains representative of a total of 729 epidemic isolates, most of them isolated from respiratory samples in intensive care unit facilities, and all collected during outbreaks in 19 public hospitals located in 17 Spanish provinces between 1997 and 2007. These 729 isolates were previously genotyped by Apal PFGE, returning 59 pulsotypes that grouped into 16 epidemic PFGE clones.<sup>6</sup> These 59 strains were also subjected to multilocus sequence typing (MLST) (<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Abaumannii.html>), giving seven sequence types (STs): ST2, ST3, ST15, ST32, ST79, ST80 and ST81 (see Figure S1, available as Supplementary data at JAC Online).

### Antimicrobial susceptibility

Antimicrobial susceptibility testing, also previously undertaken,<sup>6</sup> showed all 59 strains to have a multidrug-resistant phenotype.

In the present work, Etest strips (AB Biodisk, Solna, Sweden) were used to detect MBL production, comparing the MICs obtained for imipenem and imipenem+EDTA. A difference between the imipenem and imipenem+EDTA of  $\geq 3 \log_2$  dilutions or an imipenem/imipenem+EDTA ratio of  $\geq 8$  was interpreted as indicative of MBL activity, according to the manufacturer's instructions. The control strains were *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. The Etest results were interpreted using the CLSI criteria for *Acinetobacter* spp.<sup>7</sup> All intermediate susceptibility results (i.e. neither clearly resistant nor susceptible) were categorized as representing resistance.

### $\beta$ -Lactamase and IS screening

Uniplex PCR assays were used to detect the following  $\beta$ -lactamase genes: *bla*<sub>ADC</sub> for ADC;<sup>8</sup> the four CHO genes *bla*<sub>OXA-51-like</sub>,<sup>9</sup> *bla*<sub>OXA-23-like</sub>,<sup>9,10</sup> *bla*<sub>OXA-40-like</sub><sup>9</sup> and *bla*<sub>OXA-58-like</sub>,<sup>9</sup> and the six MBL genes *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>SIM-1</sub>, *bla*<sub>GIM-3</sub>, *bla*<sub>SPM-1</sub><sup>12</sup> and *bla*<sub>NDM-1</sub>.<sup>4</sup> The ISs sought were IS*Aba1*,<sup>12</sup> IS*Aba2*,<sup>13</sup> IS*Aba3*,<sup>13</sup> IS*Aba4*<sup>14</sup> and IS18.<sup>13</sup> To determine the upstream and/or downstream location of each IS in relation to a  $\beta$ -lactamase gene, the appropriate primers and PCR conditions described by Woodford et al.<sup>9</sup> were used.

### Sequencing and data analysis

The PCR products obtained were purified using the QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany). Sequencing was performed in a 3730XL sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The sequences were assembled using Lasergene SeqMan II software (DNA Star, Inc., Madison, WI, USA). Sequences were aligned and amino acids deduced using the ClustalW routine of the Lasergene MegAlign version 6.1 software package (DNA Star, Inc.). Polymorphism analysis was performed using DnaSP version 5.10 software (Julio Rozas et al., University of Barcelona, Spain).

## Results and discussion

### MBL phenotype and genotype assessment

The Etest showed a total of 40 (67.8%) strains to have MBL-positive phenotypes. However, all these positive results were interpreted as probable false positives since no strain was positive for *bla*<sub>MBL</sub>

(*bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>GIM-1</sub>, *bla*<sub>SIM-1</sub>, *bla*<sub>SPM-1</sub> or *bla*<sub>NDM-1</sub>) in PCR amplifications. This is known to occur, however, in MBL-negative CHO-positive strains with phenotypic carbapenem resistance. A suggested explanation is that, in the presence of EDTA, oxacillinases change to a less active state, leading to a drastic reduction in MICs.<sup>15</sup> Table 1 shows the MICs of imipenem and imipenem+EDTA, and their distribution according to the CHO genes carried. The effect of EDTA was minimal in strains that only carried the *bla*<sub>OXA-51-like</sub> gene, moderate in those with the *bla*<sub>OXA-58-like</sub> gene and high in those carrying the *bla*<sub>OXA-40-like</sub> gene. The more efficacious the hydrolytic activity of the CHO, the more evident the synergic activity of imipenem+EDTA.

### IS detection

IS*Aba1*, IS*Aba2*, IS*Aba3* and IS18 were amplified in 55 (93.2%), 15 (25.4%), 12 (20.3%) and 3 (5.1%) strains, respectively. IS*Aba4* was detected in no strain. Figure S1 shows the clonal distribution of these ISs. IS*Aba1* was detected upstream of *bla*<sub>ADC</sub> and *bla*<sub>OXA-51-like</sub>. Two copies of IS*Aba1* were detected upstream of both *bla*<sub>ADC</sub> and *bla*<sub>OXA-51-like</sub> in 13 strains distributed among ST2, ST15 and ST79, showing the great capacity of IS*Aba1* to insert itself into the same genome at different points.<sup>16</sup> Finally, IS*Aba2*, IS*Aba3* and IS18 were all associated with *bla*<sub>OXA-58-like</sub>.

### ADC analysis

*bla*<sub>ADC</sub> was amplified in all strains, with 10 allelic variants detected. Analysis of these 10 ADC partial sequences returned 55 polymorphic sites (41 synonymous and 14 non-synonymous mutations). Five sequences were exclusively identical to ADC-1, ADC-2, ADC-5, ADC-11 and ADC-25. The sequence ADC-29/30/57 was consistent with ADC-29, ADC-30 and ADC-57. Finally, four newly detected ADC sequences (provisionally named ADC-1-like<sub>P240S</sub>, ADC-2-like<sub>N260H/T264N</sub>, ADC-11-like<sub>Q163K</sub> and ADC-11-like<sub>G342R</sub>) were assigned the GenBank accession numbers JQ765381, JQ765383, JQ765382 and JQ765380, respectively. These new sequences differed from the respective ADC types in the amino acid substitutions indicated in subscripts. Figure S1 and Table 2 show the clonal distribution and diversity of the ADC sequences detected. The only IS associated with *bla*<sub>ADC</sub> was IS*Aba1*. However, no phenotypic differences were observed between the strains ( $n=54$ ) with IS*Aba1* upstream of *bla*<sub>ADC</sub> and those that did not have IS*Aba1* ( $n=5$ ), and between the different ADC types detected; all were resistant to wide-spectrum cephalosporins.

### CHO analysis

The intrinsic *bla*<sub>OXA-51-like</sub> gene was detected in all strains, with eight allelic variants obtained. Figure S1 shows the clonal distribution of the different CHOs and the diversity of the OXA-51 sequences. The different allelic variants of *bla*<sub>OXA-51-like</sub> showed a biased distribution in the three international clones of *A. baumannii* that had been previously observed.<sup>17</sup> The most common, OXA-65/66/76/79 (45.8%), was consistent with OXA-65, OXA-66, OXA-76 and OXA-79, and was mainly distributed among ST2 (international clone II). OXA-69/92/112 (10.2% of strains) was associated with ST81, which is included in the

Villalón et al.

**Table 1.** Distribution of IPM and IPI MICs correlated with the presence of CHO genes in MDRAB

MDRAB population (no. of strains)	Antimicrobial agent	Number of pulsotypes inhibited at each concentration (mg/L) <sup>a</sup>											MIC <sub>50</sub> (mg/L)	MIC <sub>90</sub> (mg/L)
		<1	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256		
Total population (n=59)	IPM	0	2	2	9	5	7	0	4	14	5	11	128	>256
	IPI	10	7	14	18	9	0	1	0	0	0	0	4	8
Only <i>bla</i> <sub>OXA-51-like</sub> <sup>b</sup> (n=13)	IPM	0	2	2	8	0	1	0	0	0	0	0	4	4
	IPI	7	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	<1	2
<i>bla</i> <sub>OXA-58-like</sub> (n=12)	IPM	0	0	0	1	5	6	0	0	0	0	0	8	16
	IPI	3	4	5	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2
<i>bla</i> <sub>OXA-40-like</sub> (n=34)	IPM	0	0	0	0	0	0	0	4	14	5	11	128	>256
	IPI	0	0	6	18	9	0	1	0	0	0	0	4	8

IPM, imipenem; IPI, imipenem+EDTA.

<sup>a</sup>IPM/IPI Etest strips were only used for MBL detection. Imipenem susceptibility was tested by standard Etest strips (data shown in Figure S1). CLSI imipenem breakpoints for *Acinetobacter* spp. are susceptible ( $\leq 4$  mg/L) and resistant ( $\geq 16$  mg/L).

<sup>b</sup>Strains that only carry the CHO *bla*<sub>OXA-51-like</sub> gene.

**Table 2.** Diversity and distribution of ADC types in epidemic MDRAB strains

ADC type	Amino acid position and changes <sup>a</sup>												Frequency (%)	ST distribution	GenBank accession number
	150	163	167	240	242	260	264	270	283	287	341	342			
ADC-1	K	K	S	P	G	H	N	A	R	N	N	R	26/59 (44.1)	2, 79, 80	AJ009979
ADC-1-like <sub>P240S</sub> <sup>d</sup>	—	—	—	S	—	—	—	—	—	—	—	—	5/59 (8.5)	2	JQ765381
ADC-2	Q	—	P	—	D	N	T	T	—	—	—	G	1/59 (1.7)	15	AY117427
ADC-2-like <sub>N260H/T264N</sub> <sup>b</sup>	Q	—	P	—	D	—	—	T	—	—	—	G	3/59 (5.1)	3	JQ765383
ADC-5	Q	Q	P	—	D	—	T	F	G	—	—	G	4/59 (6.8)	79	AJ575184
ADC-11	Q	Q	P	—	D	—	—	F	—	—	—	G	1/59 (1.7)	81	CP001172
ADC-11-like <sub>G342R</sub> <sup>b</sup>	Q	Q	P	—	D	—	—	F	—	—	—	—	5/59 (8.5)	81	JQ765380
ADC-11-like <sub>Q163N</sub> <sup>b</sup>	Q	—	P	—	D	—	—	F	—	—	—	G	1/59 (1.7)	32	JQ765382
ADC-25	—	—	—	—	D	—	—	—	—	—	—	G	9/59 (15.3)	2	EF016355
ADC-29/30/57 <sup>c</sup>	—	—	—	—	D	—	—	—	—	—	T	—	4/59 (6.8)	2	CP002522

<sup>a</sup>With reference to the 1152 bp ADC-1 sequence (GenBank accession number AJ009979). The analysis takes in nucleotide positions 445–1039, which correspond to amino acid positions 149–346. No change is indicated by a dash.

<sup>b</sup>ADC-1-like, ADC-2-like and ADC-11-like sequences differ from ADC-1, ADC-2 and ADC-11, respectively, in the amino acid substitutions indicated in subscripts.

<sup>c</sup>ADC-29/30/57 corresponds to a partial ADC sequence consistent with ADC-29, ADC-30 and ADC-57 sequences.

international complex 1. An association was also observed for OXA-71 and ST3 (international clone III).

*bla*<sub>OXA-40-like</sub> was PCR-amplified in 34 (57.6%) strains and showed just one allele distributed among ST2, ST3, ST32, ST79 and ST80. The sequenced fragment took in 511–699 nucleotide positions, according to the DBL (class D  $\beta$ -lactamases) numbering system. No IS was detected close to *bla*<sub>OXA-40-like</sub>. A high level of resistance to imipenem was detected in all those strains.

Twelve strains (20.3%) harboured a single *bla*<sub>OXA-58-like</sub> allele. The sequenced fragment took in 52–579 nucleotide positions (DBL numbering system). This gene was always associated with some IS.<sup>13</sup> The most common combinations were upstream-ISAb2 and downstream-ISAb3 (eight pulsotypes distributed among ST15, ST79 and ST81), downstream-ISAb3 (one pulsotype in ST79)

and upstream-IS18 (in three pulsotypes of clone D6 of ST2). All strains that carried *bla*<sub>OXA-58-like</sub> were resistant to imipenem, except for the susceptible Ab3 strain (Figure S1). The absence in Ab3 of any IS upstream of *bla*<sub>OXA-58-like</sub> may be an indirect indicator of the enhancing effect of ISAb2 and IS18 on the expression of OXA-58.

*bla*<sub>OXA-23-like</sub> was detected in no member of the studied population.

### Imipenem susceptibility

Susceptibility to imipenem was seen in 25.4% of the studied strains, distributed among three of the seven STs: ST2, ST79 and ST81 (Figure S1). Heteroresistance to this agent was

recorded for 27 (45.8%) strains and was widely distributed among the STs. The high imipenem MICs recorded may have been due to the activity of CHOs other than OXA-51. As in a study performed by Héritier *et al.*,<sup>18</sup> the present results showed the *bla*<sub>OXA-58-like</sub>-carrying strains to be less resistant to imipenem (MIC range from 4 to >32 mg/L) than the highly resistant *bla*<sub>OXA-40-like</sub>-carrying strains (MICs >32 mg/L).

#### Distribution of ADCs, CHOs and ISs in the MLST STs

ST2, which corresponds to international clone II,<sup>19</sup> was the most common ST in the studied population (accounting for 47.5% of all strains). It was involved in many outbreaks in 10 Spanish provinces during the study period (1997–2007). It was also the most complex, showing many genetic profiles (PFGE clones D1–D7).<sup>6</sup> This diversity was not observed in rest of the STs studied in the present work, probably because of their smaller numerical representation and/or their more restricted geographic and temporal distribution. All the STs showed a clear clonal distribution of the *bla* genes and their ISs, and in terms of susceptibility to imipenem (Figure S1).

#### Conclusions

In conclusion, the present analysis of carbapenem resistance in an epidemic MDRAB population in which ST2 is widely represented showed MBL genes to be absent, *ISAba1* to be the most common IS (and to be located upstream of *bla*<sub>ADC</sub> and *bla*<sub>OXA-51-like</sub>), and OXA-23 (which has been found worldwide) to be absent and replaced by OXA-40 as the main factor affording resistance to imipenem.

#### Acknowledgements

We thank Dr Germán Bou (La Coruña, Spain) for providing the control strains positive for *bla*<sub>OXA-23-like</sub> and *bla*<sub>VIM</sub>, the clinical microbiologists involved in the isolation and submission of the *A. baumannii* strains to the Taxonomy Laboratory at the CNM, and Adrian Burton for editing and language assistance (Physical Evidence Scientific Translations; <http://physicalevidence.es/english/welcome>).

#### Funding

This work was partially supported by the Instituto de Salud Carlos III (MPY 1116/07).

#### Transparency declarations

None to declare.

#### Supplementary data

Figure S1 is available as Supplementary data at JAC Online (<http://jac.oxfordjournals.org/>).

#### References

- 1 Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2008; **21**: 538–82.
- 2 Hujer KM, Hornza NS, Hujer AM *et al.* Identification of a new allelic variant of the *Acinetobacter baumannii* cephalosporinase, ADC-7  $\beta$ -lactamase: defining a unique family of class C enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 2941–8.
- 3 Poirer L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect* 2006; **12**: 826–36.
- 4 Chen Y, Zhou Z, Jiang Y *et al.* Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in China. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**: 1255–9.
- 5 JS Finder. Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaires. <http://www-is.biotoul.fr> (4 June 2012, date last accessed).
- 6 Villalón P, Valdezate S, Medina-Pascual MJ *et al.* Clonal diversity of nosocomial epidemic *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Spain. *J Clin Microbiol* 2011; **49**: 875–82.
- 7 Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-first Informational Supplement M100-S21*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2011.
- 8 Bou G, Martínez-Beltrán J. Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC  $\beta$ -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**: 428–32.
- 9 Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM *et al.* Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents* 2006; **27**: 351–3.
- 10 Merklér AK, Centrón D. *bla*<sub>OXA-51-type</sub>  $\beta$ -lactamase genes are ubiquitous and vary within a strain in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents* 2006; **28**: 110–3.
- 11 Ellington MJ, Kistler J, Livermore DM *et al.* Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo- $\beta$ -lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2007; **59**: 321–2.
- 12 Merklér AK, Catalano M, Ramírez MS *et al.* Polyclonal spread of *bla*<sub>OXA-23</sub> and *bla*<sub>OXA-58</sub> in *Acinetobacter baumannii* isolates from Argentina. *J Infect Dev Ctries* 2008; **2**: 235–40.
- 13 Poirer L, Nordmann P. Genetic structures at the origin of acquisition and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene *bla*<sub>OXA-58</sub> in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 1442–8.
- 14 Corvec S, Poirer L, Naas T *et al.* Genetics and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene *bla*<sub>OXA-23</sub> in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 1530–3.
- 15 Segal H, Elisha BG. Use of Etest MBL strips for the detection of carbapenemases in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2005; **56**: 598.
- 16 Segal H, Gorny S, Elisha BG. Is *ISAba1* customized for *Acinetobacter*? *FEMS Microbiol Lett* 2005; **243**: 425–9.
- 17 Evans BA, Hamouda A, Towner KJ *et al.* OXA-51-like  $\beta$ -lactamases and their association with particular epidemic lineages of *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* 2008; **14**: 268–75.
- 18 Héritier C, Poirer L, Lambert T *et al.* Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 3198–202.
- 19 Diancourt L, Passet V, Nemeč A *et al.* The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PLoS One* 2010; **5**: e10034.

Material y Métodos  
Resultados - Artículo 2

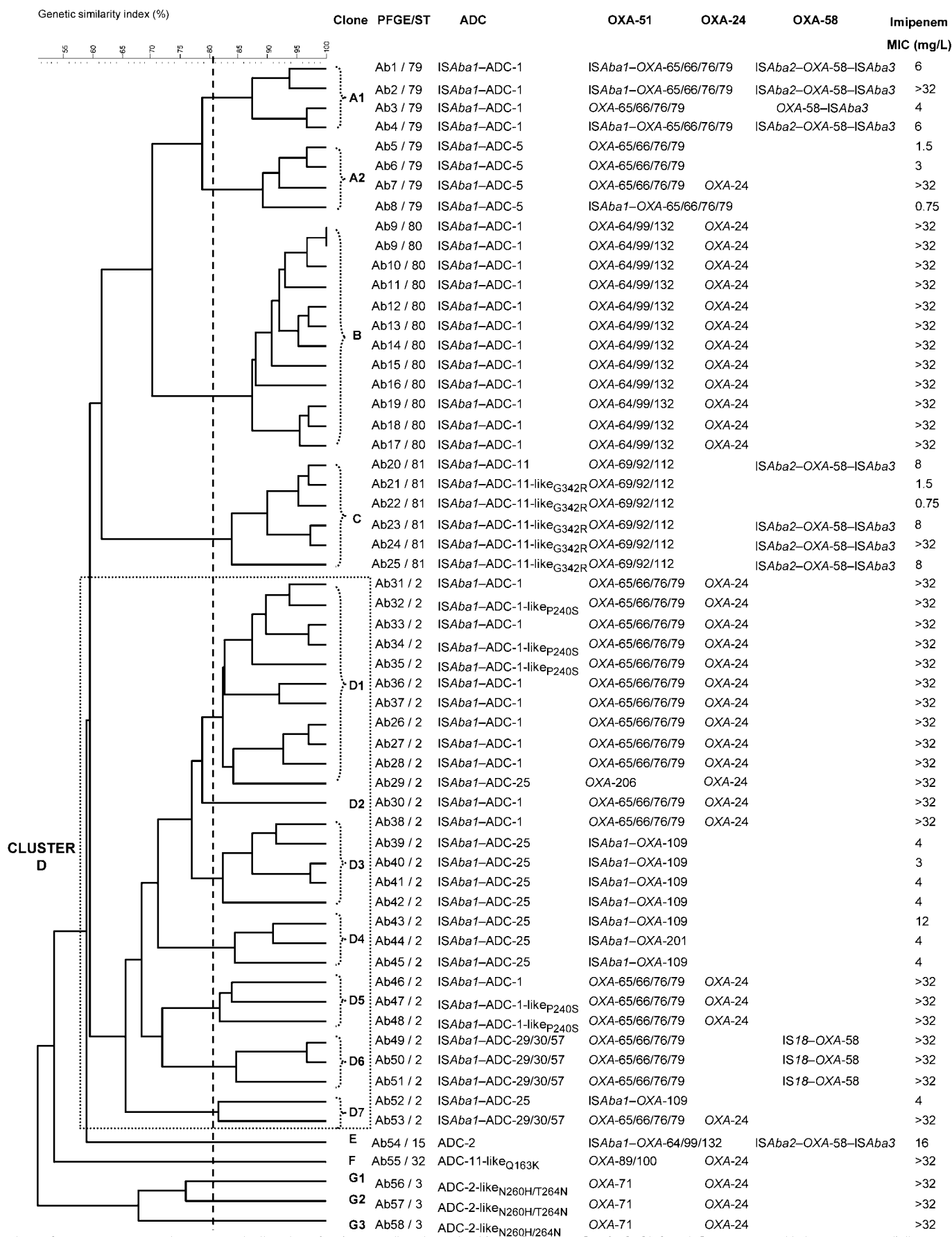


Figure S1. Dendrogram showing the genetic diversity of *A. baumannii* as determined by PFGE and MLST; ADC, CHO and IS patterns; and imipenem susceptibility. The broken line corresponds to the cut-off level (80%) used to define single PFGE clones. Dotted squares mark the boundaries of cluster D.



## ARTÍCULO 3

---

**TÍTULO:** “Brote por *Acinetobacter baumannii* multirresistente en una unidad de cuidados intensivos polivalente: análisis clínico, epidemiológico y evolución de patrones de PFGE”

**TITLE:** “Outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* in a polyvalent intensive care unit: clinical, epidemiological analysis and PFGE-printing evolution”

Publicado en *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, año 2009. 28: 1281-1284

Posición del doctorando: quinto autor

© Permisos obtenidos de Springer Science y Business Media

**SPRINGER LICENSE  
TERMS AND CONDITIONS**

Jul 27, 2015

This is a License Agreement between Pilar Villalon ("You") and Springer ("Springer") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Springer, and the payment terms and conditions.

**All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.**

License Number	3677041288952
License date	Jul 27, 2015
Licensed content publisher	Springer
Licensed content publication	European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
Licensed content title	Outbreak of multiresistant <i>Acinetobacter baumannii</i> in a polyvalent intensive care unit: clinical, epidemiological analysis and PFGE-printing evolution
Licensed content author	J. Monterrubio-Villar
Licensed content date	Jan 1, 2009
Volume number	28
Issue number	10
Type of Use	Thesis/Dissertation
Portion	Full text
Number of copies	15
Author of this Springer article	Yes and you are the sole author of the new work
Order reference number	None
Title of your thesis / dissertation	Clonalidad y resistencia en <i>Acinetobacter baumannii</i> y <i>Acinetobacter</i> spp. en la infección nosocomial
Expected completion date	Oct 2015
Estimated size(pages)	100
Total	0.00 USD

Terms and Conditions

**Introduction**

The publisher for this copyrighted material is Springer Science + Business Media. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

**Limited License**

With reference to your request to reprint in your thesis material on which Springer Science and Business Media control the copyright, permission is granted, free of charge, for the use indicated in your enquiry.

Licenses are for one-time use only with a maximum distribution equal to the number that you identified in the licensing process.

This License includes use in an electronic form, provided its password protected or on the university's intranet or repository, including UMI (according to the definition at the Sherpa website: <http://www.sherpa.ac.uk/romeo/>). For any other electronic use, please contact Springer at ([permissions.dordrecht@springer.com](mailto:permissions.dordrecht@springer.com) or [permissions.heidelberg@springer.com](mailto:permissions.heidelberg@springer.com)).

The material can only be used for the purpose of defending your thesis limited to university-use only. If the thesis is going to be published, permission needs to be re-obtained (selecting "book/textbook" as the type of use).

Although Springer holds copyright to the material and is entitled to negotiate on rights, this license is only valid, subject to a courtesy information to the author (address is given with the article/chapter) and provided it concerns original material which does not carry references to other sources (if material in question appears with credit to another source, authorization from that source is required as well).

Permission free of charge on this occasion does not prejudice any rights we might have to charge for reproduction of our copyrighted material in the future.

#### Altering/Modifying Material: Not Permitted

You may not alter or modify the material in any manner. Abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of the author (s) and/or Springer Science + Business Media. (Please contact Springer at ([permissions.dordrecht@springer.com](mailto:permissions.dordrecht@springer.com) or [permissions.heidelberg@springer.com](mailto:permissions.heidelberg@springer.com)))

#### Reservation of Rights

Springer Science + Business Media reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

#### Copyright Notice:Disclaimer

You must include the following copyright and permission notice in connection with any reproduction of the licensed material: "Springer and the original publisher /journal title, volume, year of publication, page, chapter/article title, name(s) of author(s), figure number (s), original copyright notice) is given to the publication in which the material was originally published, by adding; with kind permission from Springer Science and Business Media"

#### Warranties: None

Example 1: Springer Science + Business Media makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

Example 2: Springer Science + Business Media makes no representations or warranties with respect to the licensed material and adopts on its own behalf the limitations and disclaimers established by CCC on its behalf in its Billing and Payment terms and conditions for this licensing transaction.

#### Indemnity

You hereby indemnify and agree to hold harmless Springer Science + Business Media and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any

and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

#### No Transfer of License

This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without Springer Science + Business Media's written permission.

#### No Amendment Except in Writing

This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of Springer Science + Business Media, by CCC on Springer Science + Business Media's behalf).

#### Objection to Contrary Terms

Springer Science + Business Media hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and Springer Science + Business Media (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

#### Jurisdiction

All disputes that may arise in connection with this present License, or the breach thereof, shall be settled exclusively by arbitration, to be held in The Netherlands, in accordance with Dutch law, and to be conducted under the Rules of the 'Netherlands Arbitrage Instituut' (Netherlands Institute of Arbitration).**OR:**

**All disputes that may arise in connection with this present License, or the breach thereof, shall be settled exclusively by arbitration, to be held in the Federal Republic of Germany, in accordance with German law.**

#### Other terms and conditions:

v1.3

Questions? [customercare@copyright.com](mailto:customercare@copyright.com) or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

---

## Outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* in a polyvalent intensive care unit: clinical, epidemiological analysis and PFGE-printing evolution

J. Monterrubio-Villar · C. González-Velasco ·  
S. Valdezate-Ramos · A. Córdoba-López ·  
P. Villalón-Panzano · J. A. Saéz-Nieto

Received: 30 April 2009 / Accepted: 5 July 2009 / Published online: 29 July 2009  
© Springer-Verlag 2009

**Abstract** An outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* (MRAB) occurred over the course of a 27-week period in our adult polyvalent intensive care unit (ICU). Twenty-one patients were affected, and 72 strains were identified from different clinical samples. The strains were resistant to all antibiotics except for colistin and ampicillin/sulbactam. Forty-nine MRAB strains collected from 18 patients were analysed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). This analysis revealed four highly-related PFGE types (genetic similarity index >90%) termed 1, 2, 3 and 4, that were isolated in 13, seven, one, and three patients, respectively. A single PFGE type was identified from five of ten patients with successive isolation of MRAB; in the other five patients, two or three PFGE types were detected. This suggested phased evolution of PFGE types 2, 3 and 4 from PFGE type 1. Global mortality was high (13 patients; 62%). Non-survivors had higher APACHE II scores than survivors on the date that MRAB was isolated (OR=1.57; 95% CI [1.02, 2.44]). The outbreak was controlled after implementation of an extensive infection control program.

In recent years, nosocomial infections caused by *Acinetobacter baumannii* have emerged as a problem worldwide [1], particularly in patients admitted to intensive care units (ICUs). The pathogen *A. baumannii* can survive for long periods on dry surfaces [2] and on the skin of hospital staff [3], making it difficult to control. Infection or colonization in hospital settings have two main patterns: endemic resistant *A. baumannii* strains of polyclonal origin [4, 5] and outbreaks caused by a single strain [6, 7].

The aim of our study was to analyse an outbreak of multidrug-resistant *A. baumannii* (MRAB) in our ICU caused by several *A. baumannii* pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) types to characterize the clinical and epidemiological features of the outbreak and to describe the infection control measures that were ultimately effective in our hospital.

The MRAB outbreak occurred from July 2005 to January 2006 in an eight-bed adult mixed ICU in a 297-bed community hospital. Twenty-one patients hospitalized in the ICU were infected or colonized by an epidemic MRAB strain; 72 strains were isolated from clinical samples. Episodes of colonization or infection were considered acquired in the ICU if they appeared within 72 h of ICU admission. In July 2005, there were two MRAB isolates. The first patient was a 40-year-old male with a respiratory infection and atrial flutter with high ventricular rate who was ventilated for a long period. MRAB was cultured from his respiratory secretions after 33 days in the ICU. The number of MRAB isolates increased to a maximum of 22 in August, decreased to 14 in the next three months and progressively disappeared over the final two months of the outbreak.

The infected/colonized patients represented approximately 12.4% of the total population of ICU patients admitted during the outbreak, and the incidence of *A. baumannii* infection/colonization in 2003 and in the first six

J. Monterrubio-Villar (✉) · A. Córdoba-López  
Intensive Care Unit, Hospital Don Benito-Villanueva,  
Health Service of Extremadura,  
06400 Don Benito, Badajoz, Spain  
e-mail: suso1@orangecorreo.es

C. González-Velasco  
Microbiology Department, Hospital Don Benito-Villanueva,  
Health Service of Extremadura,  
06400 Don Benito, Badajoz, Spain

S. Valdezate-Ramos · P. Villalón-Panzano · J. A. Saéz-Nieto  
Bacteriology Department, National Centre of Microbiology,  
Carlos III Health Institute,  
28220 Majadahonda, Madrid, Spain

months of 2004 was 2.4% and 2.2%, respectively. The strains isolated in 2003–2004 were susceptible to imipenem,  $\beta$ -lactams and aminoglycosides. There were no cases of *A. baumannii* in the ICU in the year prior to this outbreak (from July 2004 to July 2005).

The demographics, chronic health status according to the McCabe and Jackson classification, chronic diseases, severity of illness as reflected by the APACHE II score, risk factors for infection/colonization, clinical status, microbiological data and outcome were analysed and compared between survivors and non-survivors.

To test for differences between survivors and non-survivors, we used the Wilcoxon-Mann-Whitney test for quantitative variables, and Pearson's chi-squared test or Fisher's exact test for qualitative variables. Statistical significance was set at  $P \leq 0.05$ . Finally, a multivariate study was performed using stepwise logistic regression analysis to evaluate the variables or factors associated with mortality. Independent variables and factors were tested for correlation with the occurrence of death using multivariate analysis. The magnitude of the effect was measured from the corresponding odds ratios (ORs) and from the 95% confidence intervals (CIs).

MRAB was collected from clinical specimens using standard methods [8] and isolated by culture with MacConkey agar plates. *Acinetobacter* isolates were identified by standard biochemical reactions using the Wider system with gram-negative card (Soria Melguizo, Spain) and the Api NE system (bioMérieux, France). Susceptibility to the following antimicrobials was determined by the microdilution method using the Wider commercial system with the gram-negative card (Soria Melguizo, Spain) and by the disk diffusion method [9]: ampicillin, ampicillin/sulbactam, piperacillin/tazobactam, cefepime, ceftazidime, cefotaxime, aztreonam, imipenem, meropenem, gentamicin, tobramycin, amikacin, ciprofloxacin, ofloxacin and colistin [8]. The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) standard breakpoints available for *Acinetobacter spp.* organisms were used to determine susceptibility. In the absence of breakpoints, the *Enterobacteriaceae* criteria were used. For analysis, we grouped the 'intermediate resistance' antibiotics with those in the 'resistance' category. Multidrug resistance was defined as resistance to at least four separate classes of antibiotics. *Escherichia coli* ATCC 25922 was used as the control strain [9].

PFGE type characterization was carried out as follows. Whole-cell DNA from MRAB strains was embedded in agarose, lysed, and cleaved with the restriction enzyme *Apal* (60 U, Roche Diagnostic, Barcelona, Spain) [10]. The relatedness of the PFGE types was determined using Infoquest (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) to compare the PFGE fingerprints. The percent similarity between chromosomal fingerprints was scored by the unweighted pair group method using the averaging

algorithm (UPGMA) and Dice coefficient [11]. A band position tolerance of 1.0% was used to analyse PFGE patterns. PFGE types were considered distinct when they differed by at least one band.

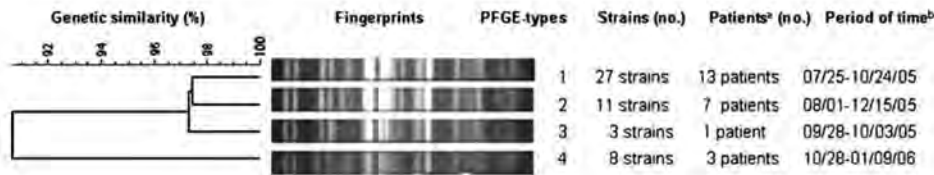
Seventy-two strains of MRAB were isolated from 21 patients resulting in a mean value of 3.4 isolates per patient. There were 36 clinical samples from the respiratory tract of 20 patients, 17 isolates from catheter tips of nine patients, ten positive blood cultures in eight patients, five isolates from urine in four patients and four positive wound exudates in three patients. All MRAB strains showed the same antimicrobial susceptibility profile, i.e. resistance to all tested antimicrobials with imipenem MICs values  $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ , except for ampicillin/sulbactam ( $< 8/4 \mu\text{g/ml}$ ) and colistin ( $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ ).

After MRAB isolation, five patients were treated with intravenous colistin, aerosolized colistin and ampicillin/sulbactam; two patients were treated with intravenous colistin and ampicillin/sulbactam; five patients were treated with aerosolized colistin and ampicillin/sulbactam; one patient was treated with intravenous and aerosolized colistin; one patient was treated with ampicillin/sulbactam; and seven patients received no specific antibiotic therapy. With regard to the latter group, five of the seven patients died. The daily doses of intravenous sulbactam and aerosolized and intravenous colistin ranged from 2–6 g, 1–6 million IU and 2.5–6 million IU, respectively, with adjustment of the dosage dependent on renal function.

The ICU mortality rate was 57.1% (12 patients) and the global mortality rate was 61.9% (13 patients). Microbiological evolution was harmless in 57.1% of the total population and fatal in 42.9%.

Comparing survivors and non-survivors using univariate analysis, the following variables showed statistical significance: the presence of cardiovascular disease (37.5% vs 92.3%,  $P=0.014$ ), favourable microbiological evolution (100% vs 30.8%,  $P=0.005$ ), the APACHE II score on the date of MRAB isolation ( $12 \pm 2.39$  vs  $16.23 \pm 3.94$ ,  $P=0.025$ ) and the number of days of hospitalization ( $75.50 \pm 43$  vs  $41.23 \pm 44.84$ ,  $P=0.045$ ). There were no differences with respect to specific antimicrobial therapy with either ampicillin/sulbactam or colistin (or both) after MRAB isolation. These variables were included in a stepwise logistic regression model that showed that the APACHE II score on the date of MRAB isolation was independently associated with mortality (OR=1.57; 95% CI [1.02, 2.44]).

Molecular characterisation of 49 MRAB strains collected from 18 patients with infections/colonizations showed four PFGE types. The genetic similarity coefficients for these highly-related PFGE types ranged from 90–97% as shown in the cluster analysis (Fig. 1). PFGE type 1 was the first type to emerge, followed by PFGE types 2, 3 and 4. The predominant PFGE type was PFGE type 1, detected in 13



**Fig. 1** Genetic relatedness of *A. baumannii* pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) types using *Apal*-PFGE profiles detected in 18 ICU patients. PFGE types are coded by time of emergence and similarity.

A percent genetic similarity scale is shown above the dendrogram. <sup>a</sup>Patients with a single PFGE type and patients with 1, 2 or 3 PFGE types; <sup>b</sup>Month/day/year

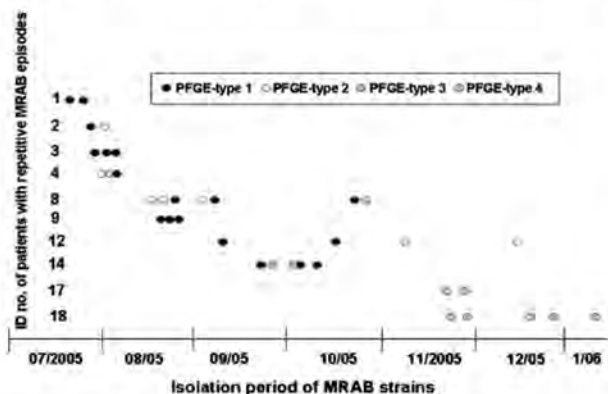
patients (17 tracheal aspirates, 5 blood cultures, 3 urine cultures, 1 catheter tip, 1 wound exudate). PFGE type 2, 3 and 4 were detected in only seven, one and three patients, respectively. The sample distribution for PFGE type 2 was seven tracheal aspirates, two catheter tips, one blood culture and one urine culture; PFGE type 3 was isolated from three catheter tips; and PFGE type 4 was isolated from five catheter tips, one tracheal aspirate, one blood culture and one wound exudate. Of the 18 patients studied, eight patients had a single MRAB episode, while ten patients experienced repeated MRAB episodes. A single PFGE type was identified in half of the ten patients from whom MRAB was successively isolated. For example, PFGE type 4 was isolated in five samples from patient number 18 over the course of two-and-a-half months (Fig. 2). In contrast, two or three different PFGE types were detected in the other five patients. In patient number 8, PFGE type 1 was detected four days after PFGE type 2 was detected; 13 days later, PFGE type 2 was detected again; PFGE type 1 was again detected two days after and 48 days later. Finally, PFGE type 4 emerged three days later (Fig. 2).

cohorting the infected/colonised patients inside the unit, restricting carbapenem use, informing all ICU staff of the outbreak, cohorting nursing and reinforcing the need for hand washing with an alcohol-based gel. The second step consisted of implementing strict barrier precautions (sterile gloves and gowns, mask and eye protection), limiting the number of clinical examinations and number of visits, and rigorous cleaning of all surfaces with 0.1% hypochlorite.

We implemented infection control measures in accordance with those recommended previously [4, 12] in a staged process that resulted in the disappearance of new *A. baumannii* isolates in the following three years. The first step included contacting infectious diseases specialists,

There are multiple reports of MRAB outbreaks over the last two decades in different hospital wards, especially in the ICUs of tertiary-care centres and university hospitals [13–15]. *A. baumannii* infections are reported less frequently in community hospitals [16].

Several reports suggest that *A. baumannii* infections are not associated with a poorer prognosis than other infections or control groups [17, 18]. We found a positive, statistically significant association between the APACHE II score on the date of MRAB isolation and death. Neither septic shock nor inappropriate antimicrobial therapy were statistically associated with a fatal outcome. This may be due to the small number of patients of our study ( $n=21$ ) or to the fact that MRAB infection/colonization did not have any associated mortality. We found that mortality increased according to predicted mortality (based on the APACHE II score at ICU admission; between 17% and 27%), but this difference could be related to factors other than MRAB infection/colonization. It is very difficult to assess the impact of infection on mortality; even when the best methodologies are used, such as matched case-control studies, the quality of the matching process is not always assured.



**Fig. 2** Persistence and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) types evolution in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* (MRAB) strains of ten patients with repetitive isolates, hospitalized in a polyvalent ICU ward over a 27-week period

PFGE typing was a useful tool in characterizing this outbreak, and was specifically useful for discriminating among the MRAB strains in the patients over time. All of the MRAB recovered strains were closely related (genetic similarity range, 90–97.5%) and were grouped into four genotypes. PFGE type 1 was the first to be identified and was the most commonly identified type. Over the 27-week period, the PFGE type 1 was disseminated over 13 weeks, while PFGE-types 2, 3 and 4 emerged one, 13 and 18 weeks later, respectively.

In patients from whom MRAB was repeatedly isolated, some had a single type (five patients), and some had one PFGE type replaced by other very similar types (5 patients). This latter could be explained by the infection/colonization

of the hospitalized patients by more than one closely related MRAB type. Based on the known environmental longevity of *A. baumannii* in the hospital setting, such related PFGE types were most likely variants derived from a common ancestor. Changes leading to the emergence of new PFGE types (i.e., evolution) could occur both in the hospital setting (for example, on contaminated surfaces) and in the patients themselves.

*A. baumannii* is an important nosocomial microorganism because of the diversity of its reservoirs, its capacity to acquire antibiotic resistance, its resistance to desiccation, its propensity to cause outbreaks and its epidemiological complexity. Complete eradication and prevention of dissemination may require multiple interventions [19]. Our extensive infection control program, using a multifaceted approach based on MRAB PFGE type characterisation and special attention to hygiene and barrier measures, was ultimately successful. We may have underestimated the size of the outbreak because we did not perform active surveillance culturing. The eradication of MRAB during the following three years supports the hypothesis of cross-transmission between patients due to breaches in regular infection control practices.

In conclusion, we describe an ICU outbreak of MRAB with high lethality rate and respiratory site predominance affecting 21 patients. There was a significant difference between survivors and non-survivors with respect to their APACHE II scores on the date of *A. baumannii* isolation; therapy with specific antimicrobial agents was not associated with survival. PFGE analysis of 49 MRAB strains collected from 18 patients yielded four highly-related PFGE types and suggested phased evolution of the MRAB types in the hospital setting. An infection control policy based mainly on hygiene and barrier measures successfully contained the MRAB outbreak and has thus far prevented recurrence of the pathogen.

**Sources of funding** This research was supported by grant MPY 1116/07 from the Instituto de Salud Carlos III.

**Conflicts of interest statement** The authors declare no conflicts of interests.

## References

1. Villegas MV, Hartstein AI (2003) *Acinetobacter* outbreaks, 1977–2000. *Infect Control Hosp Epidemiol* 24:284–295
2. Wendt C, Dietze B, Dietz E, Rüdén H (1997) Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *J Clin Microbiol* 35:1394–1397
3. Riley TV, Webb SA, Cadwallader H, Briggs BD, Christiansen L, Bowman RA (1996) Outbreak of gentamicin-resistant *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit: clinical, epidemiological and microbiological features. *Pathology* 28:359–363
4. Corbella X, Montero A, Pujol M, Dominguez MA, Ayats J, Argerich MJ, Garrigosa F, Ariza J, Gudíol F (2000) Emergence and rapid spread of carbapenem resistance during a large and sustained hospital outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 38:4086–4095
5. García-Garmendía JL, Ortiz-Leyba C, Gamacho-Montero J, Jiménez-Jiménez FJ, Pérez-Paredes C, Barrero-Almodóvar AE, Gili-Miner M (2001) Risk factors for *Acinetobacter baumannii* bacteremia in critically ill patients: a cohort study. *Clin Infect Dis* 33:939–946
6. Bou G, Cerveró G, Dominguez MA, Quereda C, Martínez-Beltrán J (2000) Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not solely to the presence of beta-lactamases. *J Clin Microbiol* 38:3299–3305
7. del Mar Tomas M, Cartelle M, Pertega S, Beceiro A, Linares P, Canle D, Molina F, Villanueva R, Cisneros JM, Bou G (2005) Hospital outbreak caused by a carbapenem-resistant strain of *Acinetobacter baumannii*: patient prognosis and risk-factors for colonisation and infection. *Clin Microbiol Infect* 11:540–546
8. Schreckenberger PC, von Graevenitz A (1999) *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Moraxella*, *Methylobacterium*, and other nonfermentative gram-negative rods. In: Murray PR (ed) *Manual of clinical microbiology*, 7th edn. ASM Press, Washington DC, pp 539–560
9. Clinical and Laboratory Standards Institute (2008) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 18th supplement, M100-S18. CLSI, Wayne, PA, USA
10. 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
11. Nei M, Li WH (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:5269–5273
12. Garner JS (1996) Guideline for isolation precautions in hospitals. The hospital infection control practices advisory committee. *Infect Control Hosp Epidemiol* 17:53–80
13. Das I, Lambert P, Hill D, Noy M, Bion J, Elliott T (2002) Carbapenem-resistant *Acinetobacter* and role of curtains in an outbreak in intensive care units. *J Hosp Infect* 50:110–114
14. Denton M, Wilcox MH, Parnell P, Green D, Keer V, Hawkey PM, Evans I, Murphy P (2004) Role of environmental cleaning in controlling an outbreak of *Acinetobacter baumannii* on a neurosurgical intensive care unit. *J Hosp Infect* 56:106–110
15. Katragkou A, Kotsiou M, Antachopoulos C, Benos A, Sofianou D, Tamiolaki M, Roilides E (2006) Acquisition of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a pediatric intensive care unit: a case-control study. *Intensive Care Med* 32:1384–1391
16. Weermink A, Severin WP, Tjernberg I, Dijkshoorn L (1995) Pillows, an unexpected source of *Acinetobacter*. *J Hosp Infect* 29:189–199
17. Gamacho-Montero J, Ortiz-Leyba C, Fernández-Hinojosa E, Aldabó-Pallás T, Cayuela A, Marquez-Vácaro JA, García-Curiel A, Jiménez-Jiménez FJ (2005) *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia: epidemiological and clinical findings. *Intensive Care Med* 31:649–655
18. Alvarez-Lerma F, Palomar M, Insausti J, Olaechea P, Cerdá E, Castillo F, Martínez-Pellús A (2005) Infections caused by *Acinetobacter spp.* in critically ill ICU patients. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 23:533–539
19. Cefai C, Richards J, Gould FK, McPeake P (1990) An outbreak of *Acinetobacter* respiratory tract infection resulting from incomplete disinfection of ventilatory equipment. *J Hosp Infect* 15:177–182

## ARTÍCULO 4

---

**TÍTULO:** “Clones endémicos y epidémicos de *Acinetobacter baumannii*: un estudio de doce años en un hospital de tercer nivel”

**TITLE:** “Endemic and epidemic *Acinetobacter baumannii* clones: a twelve-year study in a tertiary care hospital”

Publicado en *BMC Microbiology*, año 2015. 15: 47

Posición del doctorando: primer autor

© Villalón y coautores. Concedido por BioMed Central. Artículo de Acceso Abierto distribuido bajo los términos de Creative Commons Attribution License que permite su uso, distribución y reproducción sin restricciones en cualquier medio.



RESEARCH ARTICLE

Open Access

# Endemic and epidemic *Acinetobacter baumannii* clones: a twelve-year study in a tertiary care hospital

Pilar Villalón<sup>1\*</sup>, Sylvia Valdezate<sup>1</sup>, Teresa Cabezas<sup>2</sup>, Montserrat Ortega<sup>1</sup>, Noelia Garrido<sup>1</sup>, Ana Vindel<sup>3</sup>, María J Medina-Pascual<sup>1</sup> and Juan A Saez-Nieto<sup>1</sup>

## Abstract

**Background:** Nosocomial outbreaks of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* are of worldwide concern. Using pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), multilocus sequence typing (MLST), and multiple locus variable number tandem repeat sequence (VNTR) analysis (MLVA), the present work examines the genetic diversity of the endemic and epidemic *A. baumannii* clones isolated in a single hospital over a twelve-year period.

**Results:** PFGE analysis of 405 *A. baumannii-calcoaceticus* complex isolates detected 15 *A. baumannii* endemic/epidemic PFGE types (EE1 to EE15) that grouped into five clusters: EE1-EE8, EE9, EE10, EE11 and EE12-EE15. The MLST sequence type (ST) distributions were: international clone II (ST-2) 60%, international clone III (ST-3) 26.7%, ST-15 6.7%, and ST-80 6.7%. MLVA-8<sub>Orsay</sub> returned 17 allelic profiles. The large (L) VNTR marker profiles were fully concordant with the detected STs, and concordant with 14 up to 15 PFGE types. Imipenem resistance was detected in five PFGE types; the prevalence of the *bla*<sub>OXA-58-like</sub> and *bla*<sub>OXA-40-like</sub> genes was 60% and 40% respectively.

**Conclusions:** PFGE proved to be a vital tool for analysis of the temporal and spatial distribution of the clones. MLST and the VNTR L-markers grouped the isolates into clonal clusters. The wide diversity of MLVA small (S)-markers, however, did not permit clustering. The present results demonstrate the persistence of several endemic PFGE types in the hospital, the involvement of some of them in outbreaks, and the inter hospital transmission of extensively drug-resistant ST-15 and ST-80.

**Keywords:** *A. baumannii*, PFGE, Sequence type, MLVA, Clone

## Background

The bacterium *Acinetobacter baumannii* is very tolerant to desiccation and has developed resistance against many of the antimicrobial agents in common use [1]. Both these features render it ideally suited to survive in the hospital environment, and invest it with the power to cause important nosocomial outbreaks [2]. Multidrug-resistant (MDR) *A. baumannii* infection is a worldwide health problem that has a negative impact on the morbidity and the mortality of the affected patients [3,4]. The epidemiological study of MDR *A. baumannii* outbreaks is essential if they are to be ended and their recurrence

prevented. Clonal analysis of the strains involved is a vital part of these studies [5]. This can be undertaken via genotyping techniques such as pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) [6,7], multilocus sequence typing (MLST) [7-9], and multiple locus variable number tandem repeat sequence (VNTR) analysis (MLVA) [10-12]. Genotyping provides information concerning outbreaks; e.g., the genetic diversity of clones, their temporal and spatial distribution, their implication on endemic or epidemic events, the acquisition source of the bacteria, as well as the number of affected patients; that is basic for preventive and control measures to be implemented.

A previous study of *A. baumannii* isolates from Spanish hospitals [13] showed the predominance of international clone II (sequence type 2 [ST-2]). Two novel clones were also detected - ST-79 and ST-80 - as well as international

\* Correspondence: pvillalon@isciii.es

<sup>1</sup>Laboratorio de Taxonomía, Servicio de Bacteriología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda-Pozuelo km2, 28220 Madrid, Majadahonda, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



© 2015 Villalón et al.; licensee BioMed Central. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

clonal complex I/ST-81. The minor clones detected included international clone III (ST-3), ST-15 and ST-32.

The aim of the present work was to study the endemic and epidemic clones of *A. baumannii* in a not previously studied single hospital over a long period, and to compare them, using the aforementioned genotyping methods, with other nosocomial clones circulating in Spain.

## Results

### PFGE analysis

PFGE analysis of the 405 *A. baumannii-calcoaceticus* complex isolates returned 120 different PFGE types. Among these, 105 PFGE types (covering 174 isolates) were considered sporadic given their wide genetic disparity and small number of isolates (<5). Fifteen PFGE types, however, covering 231 *A. baumannii* isolates, were considered endemic or epidemic, and selected for further study.

Figure 1 shows the PFGE genetic similarity dendrogram. The PFGE types were numbered EE1 to EE15. The Hunter-Gaston diversity index (HGDI) [14] calculated for the PFGE technique with respect to the further-examined 231 isolates was 0.880 (Table 1). The genetic similarity range for their 15 PFGE types was 60.4 – 100%.

Five clusters (75% cut-off) were observed; their genetic similarity values were EE1-EE8 (78.8 – 100%), EE9-Ab9 (94.1%), EE10-EE10\* (100%), EE11-Ab54 (89.7%), and EE12-EE15 (83.7 – 89.7%). Figure 2 shows the temporal and spatial distribution of the endemic/epidemic clones.

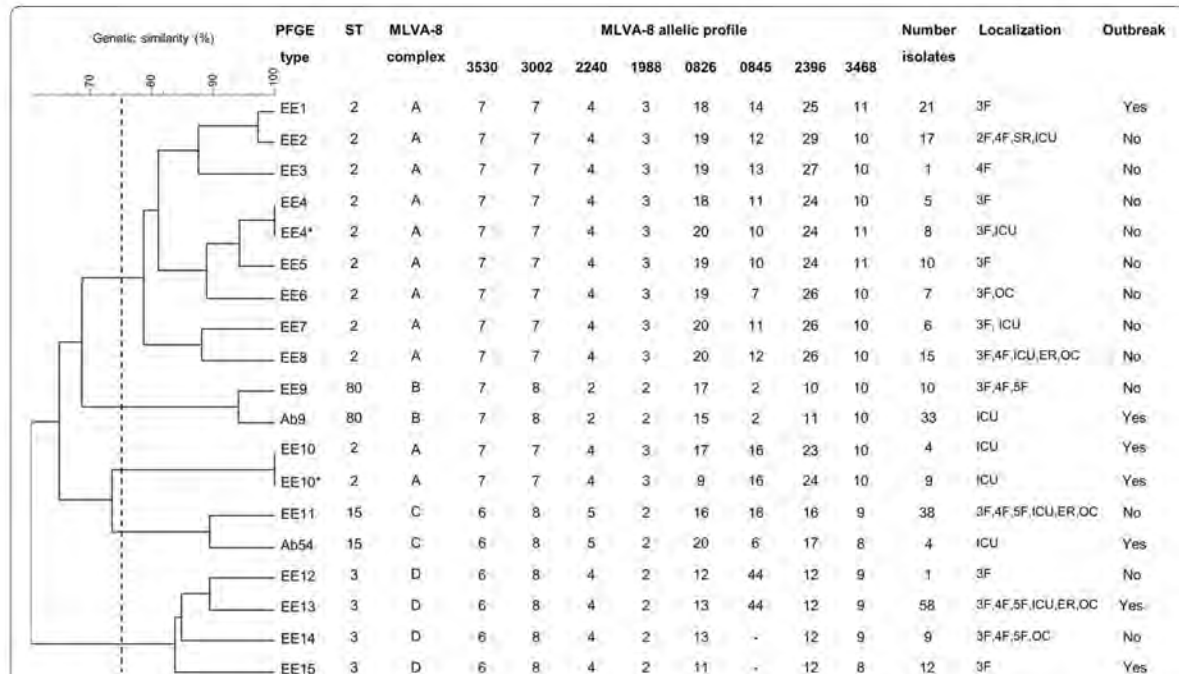
### *Acinetobacter baumannii* epidemic sequence types

For each gene, the number of alleles and polymorphic sites (in parenthesis) were: *cpn60* 4 (6), *fusA* 4 (3), *gltA* 3 (2), *pyrG* 2 (1), *recA* 3 (4), *rplB* 4 (3), and *rpoB* 4 (2). Four different STs were detected: ST-2, ST-3, ST-15 and ST-80. The HGDI for the MLST technique was 0.655 (Table 1).

International clone II (ST-2) involved clusters EE1-EE8 and EE10 (Figure 1), and included 60% of the studied PFGE types. International clone III (ST-3) involved cluster EE12-EE15 and 26.7% of the PFGE types. ST-15 and ST-80 were detected in clusters EE11 and EE9 respectively, both representing 6.7% of the PFGE types.

### *Acinetobacter baumannii* epidemic MLVA-8<sub>Orsay</sub> types

Seventeen MLVA-8<sub>Orsay</sub> allelic profiles were detected among the 15 studied PFGE types since the pairs EE4-EE4\* and EE10-EE10\* had different allelic profiles



**Figure 1** Genetic diversity of endemic and epidemic *Acinetobacter baumannii* clones. Left to right: PFGE genetic similarity dendrogram, PFGE types, sequence types (ST), MLVA-8<sub>Orsay</sub> complexes, repeat number for the eight VNTR markers, number of isolates, location in the hospital, and involvement in outbreaks. Pairs EE4-EE4\* and EE10-EE10\* had the same PFGE type but different MLVA type. The broken line in the dendrogram shows the 75% genetic similarity cut-off. Abbreviations: 2 F, second floor; 3 F, third floor; 4 F, fourth floor; 5 F, fifth floor; ICU, intensive care unit; SR, surgery room; ER, emergency room; OC, out-patient, clinic consultation room. Dash means lack of amplification. Ab9 and Ab54 are epidemic PFGE types detected in other hospitals.

**Table 1 MLVA-8<sub>Orsay</sub> data and comparison of PFGE, MLST and MLVA discriminatory power in endemic and epidemic *Acinetobacter baumannii* PFGE types**

MLVA locus or Genotyping technique	Repeat size (bp)	No. of repeats mode (no. of repeats range)	Alleles or no. of genotypes	HGDI <sup>a</sup>	CI (95%) <sup>b</sup>
Abaum_3530	60	6 (6 – 7)	2	0.502	(0.499, 0.508)
Abaum_3002	57	8 (7 – 8)	2	0.496	(0.482, 0.510)
Abaum_2240	99	4 (2 – 5)	3	0.345	(0.275, 0.415)
Abaum_1988	77-80	2 (2 – 3)	2	0.641	(0.617, 0.665)
Abaum_0826	9	13 (9 – 20)	9	0.833	(0.813, 0.853)
Abaum_0845	7	44 (2 – 44)	9	0.819	(0.795, 0.843)
Abaum_2396	6	12 (10 – 29)	9	0.807	(0.777, 0.837)
Abaum_3468	6	9 (8 – 11)	4	0.658	(0.625, 0.691)
PFGE			15	0.880	(0.858, 0.902)
MLST			4	0.655	(0.624, 0.686)
MLVA-8			17	0.883	(0.863, 0.903)

<sup>a</sup>Hunter-Gaston diversity index (HGDI) calculations were performed taking into account all 231 isolates in the studied 15 PFGE types, except for Abaum\_0845 (N = 210), owing to the lack of amplification in EE14 and EE15.

<sup>b</sup>HGDI 95% confidence interval.

despite sharing the same PFGE type. The HGDI for the technique, taking into account all the VNTR loci examined, was 0.883. The individual HGDI scores for these markers ranged from 0.345 to 0.833. Microsatellites were more diverse ( $0.658 \leq \text{HGDI} \leq 0.833$ ) than minisatellites ( $0.345 \leq \text{HGDI} \leq 0.641$ ). Assuming a 40% cut-off for MLVA-8<sub>Orsay</sub> genetic similarity (data not shown), four MLVA complexes were identified: A, B, C, and D. Figure 1 and Table 1 show the MLVA-8<sub>Orsay</sub> data. Figure 3 shows the minimum spanning tree for MLVA-8<sub>Orsay</sub> clustering.

Amplification products were obtained for all VNTR markers except for Abaum\_0845 in EE14 and EE15. A previously described, non-conserved 77–80 bp repeat unit in the Abaum\_1988 locus [11] was detected in all PFGE types, instead of the 26 bp repeat unit described by Pourcel [10].

#### Susceptibility to antimicrobial agents, $\beta$ -lactamase genes, and insertion sequences

The antimicrobial susceptibility rates recorded were 100% for colistin, 82.4% for sulbactam, 64.7% for imipenem, 64.7% for meropenem, 35.3% for amikacin, 35.3% for minocycline, 17.6% for doxycycline, and 17.6% for trimethoprim-sulfamethoxazole. All isolates showed resistance to mezlocillin, piperacillin, piperacillin-tazobactam, cefotaxime, ceftazidime, cefepime, gentamicin, tobramycin, tetracycline, ciprofloxacin, and levofloxacin.

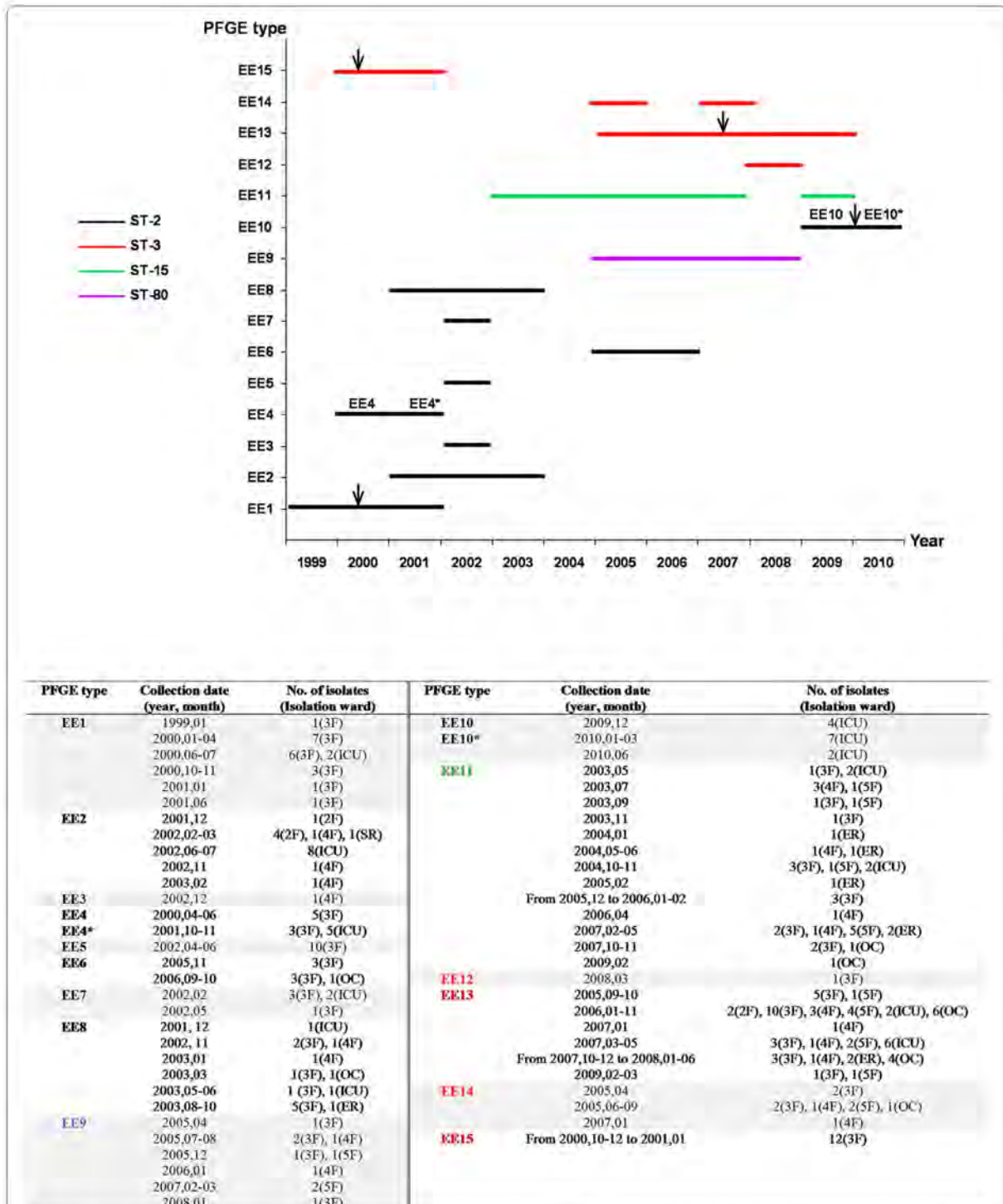
All 15 PFGE types had an extensively drug-resistant (XDR) phenotype involving non-susceptibility to  $\geq 1$  agent in all but  $\leq 2$  antimicrobial categories [15]. Resistance to imipenem (MIC  $\geq 4$   $\mu\text{g/ml}$ ) was detected in five of the PFGE types: EE1, EE9, EE10, EE11, and EE15.

Carbapenem hydrolyzing oxacillinase (CHO) genes and metallo $\beta$ -lactamase (MBL) genes were sought in

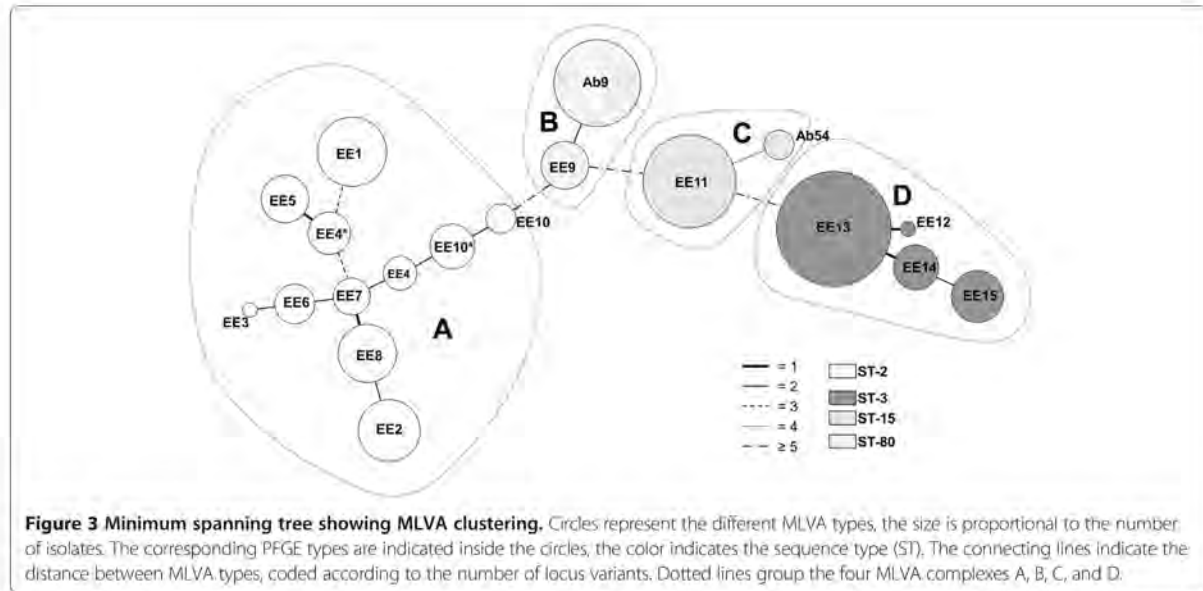
the five PFGE types resistant to imipenem, as well as in Ab9 and Ab54 (Table 2). EE1, EE11, EE15 and Ab54 carried the CHO gene *bla*<sub>OXA-58-like</sub>, with IS<sub>Aba2</sub> and IS<sub>Aba3</sub> upstream and downstream respectively. EE9, EE10, and Ab9 carried the *bla*<sub>OXA-40-like</sub> gene. No MBL genes were amplified. *Acinetobacter*-derived cephalosporinase (ADC) and OXA-51 genes were also sought among the PFGE types with ST-80 or ST-15, and compared to those of Ab9 and Ab54 (which respectively show these STs). Pairs EE11-Ab54 and EE9-Ab9 had the same pattern of ADC, OXA-51 and CHO genes and associated insertion sequences (IS) (Table 2).

#### Discussion

This study includes all *A. baumannii-calcoaceticus* complex isolates collected in a hospital during a twelve-year period. The clonal analysis of these isolates identified 15 endemic *A. baumannii* PFGE types, four of which were also epidemic because were involved in nosocomial outbreaks. Three *A. baumannii* nosocomial outbreaks occurred in the studied hospital between 1999 and 2010 (Figures 1 and 2). The first was in 1999–2000 in the pneumology area on the hospital's third floor. This affected 20 patients and involved two PFGE types: EE1 and EE15. Both, EE1 and EE15 were first detected during this outbreak and persisted endemically till 2001 on the third floor. The second outbreak was in the ICU in March 2007, with four patients affected. This was caused by PFGE type EE13. This same PFGE type was found to be endemic between 2005 and 2009 on the third, fourth, and fifth floors of the hospital, and in the ICU, the emergency room, and out-patient consultation rooms. The third outbreak, from December 2009 to March 2010, also involved the ICU and was caused by PFGE type



**Figure 2** Distribution of endemic and epidemic *Acinetobacter baumannii* PFGE types. The top chart shows the temporal distribution of the 15 endemic and epidemic PFGE types, and the sequence types (ST). Vertical arrows indicate the nosocomial outbreaks. The bottom table shows the detailed data of the temporal and spatial distribution of the PFGE types. Abbreviations: 2 F, second floor; 3 F, third floor; 4 F, fourth floor; 5 F, fifth floor; ICU, intensive care unit; SR, surgery room; ER, emergency room; OC, out-patient clinic consultation room.



EE10; four patients were affected. The remaining 11 PFGE types (EE2-EE9, EE11, EE12, and EE14) were responsible for no epidemic event, but were found to be endemic; *i. e.* they were isolated on several occasions in different parts of the hospital environment. The temporal distribution of the 15 PFGE types was variable; it showed a range from one to six years, highlighting the long persistence of EE9, EE13 and EE11 during four, five and six years, respectively. The spatial distribution of the 15 PFGE types was universal in the hospital, although third floor (113 isolates) and ICU (44 isolates) were the most affected wards, probably due to the kind of activity and patients cared in these areas. All but three PFGE types -EE2, EE3, and EE10- were detected in the third floor, and eight out of fifteen PFGE types were detected

in the ICU. The most ubiquitous PFGE types were EE8, EE11 and EE13. Long persistence, wide distribution and antimicrobial resistance are risk factors for new outbreaks. Figure 2 shows the temporal and spatial distribution of the 15 endemic/epidemic PFGE types.

The MLST results correlated with PFGE clustering. Most of the PFGE types (60%; clusters EE1-EE8 and EE10) circulating in the hospital during the study period were of sequence type ST-2 (or international clone II [9]). The majority presence of this clone is usual for Spanish hospitals [13], as in other Mediterranean countries [16], and indeed other parts of the world [17,18]. A previous study [13] showed that the highly prevalent ST-2 was detected on PFGE types that had very different DNA band patterns. This diversity is also detected in

**Table 2**  $\beta$ -lactamase genes and associated insertion sequences in *A. baumannii* with an imipenem MIC of >32  $\mu$ g/ml

PFGE type	MLST sequence type	<i>Acinetobacter</i> -derived cephalosporinase type	OXA-51 type	Acquired carbapenem hydrolyzing oxacillinase	Metallo beta-lactamase
EE1	2	Not typed	Not typed	ISAba2-OXA-58-ISAba3 <sup>d</sup>	ND <sup>g</sup>
EE10	2	Not typed	Not typed	OXA-40	ND
EE10 <sup>h</sup>	2	Not typed	Not typed	OXA-40	ND
EE15	3	Not typed	Not typed	ISAba2-OXA-58-ISAba3	ND
EE9	80	ISAba1-ADC-1 <sup>e</sup>	OXA-64/99/132 <sup>g</sup>	OXA-40	ND
Ab9 <sup>b</sup>	80	ISAba1-ADC-1	OXA-64/99/132	OXA-40	ND
EE11	15	ADC-2	ISAba1-OXA-64/99/132 <sup>g</sup>	ISAba2-OXA-58-ISAba3	ND
Ab54 <sup>b</sup>	15	ADC-2	ISAba1-OXA-64/99/132	ISAba2-OXA-58-ISAba3	ND

<sup>a</sup>EE10 and EE10\* had the same PFGE type but different MLVA type.

<sup>b</sup>Ab9 and Ab54 were epidemic PFGE types detected in other hospitals.

<sup>c</sup>ISAba1 was detected upstream of ADC-1.

<sup>d</sup>The OXA-64/99/132 sequence was consistent with OXA-64, OXA-99 and OXA-132 [23].

<sup>e</sup>ISAba1 was detected upstream of OXA-64/99/132.

<sup>f</sup>ISAba2 and ISAba3 were detected upstream and downstream of OXA-58 respectively.

<sup>g</sup>ND: not detectable.

this study with the presence of ST-2 in clusters EE1-EE8 and EE10 -which showed only 65% genetic similarity-. ST-3 (or international clone III [9], PFGE cluster EE12-EE15), has been involved in many nosocomial outbreaks around the world [19], and in the present study was the second most common within PFGE types (26.7%). ST-15 (PFGE cluster EE11) and ST-80 (PFGE cluster EE9) were the two least common (6.7%), although both have been described as involved in outbreaks in other Spanish hospitals. International clonal complex1/ST-81, and sequence types ST-79 and ST-32 were not detected in the present study, but all are important nosocomial clones previously detected in Spanish hospitals [13].

MLVA-8<sub>Orsay</sub> returned a perfect correlation between the L marker allelic profiles and the ST results. Therefore, MLVA-8<sub>Orsay</sub> L marker results correlate with PFGE clustering. The same L marker allelic profiles (and therefore STs) were even seen for certain PFGE types in different clusters, e.g., L markers 7-7-4-3 (ST-2) in clusters EE1-EE8 and EE10. The S marker allelic profiles showed a wide diversity. As an example, the same PFGE type can show different S marker allelic profiles over short periods [10]. For instance, between 2000 and 2001, a change in three S loci was recorded in PFGE type EE4 (recorded as types EE4 and EE4<sup>\*</sup>; Figures 1, 2 and 3). Similarly, over the space of just a few months between 2009 and 2010 - within the same outbreak - changes in two S loci were recorded in PFGE type EE10 (recorded as EE10 and EE10<sup>\*</sup>; Figures 1, 2 and 3). In one of the latter loci (allele 0826), the change involved a remarkable descent in the number of tandem repeats from 17 (in EE10) to 9 (in EE10<sup>\*</sup>). In fact, the diversity associated with allele 0826 has led some authors [11] to exclude it in the establishment of MLVA complexes. In the present study, the variability associated with the S markers was so great that it was not possible to define criteria for establishing MLVA complexes, neither to apply criteria defined by other authors [10,11]. The MLVA complexes were therefore defined assuming a 40% genetic similarity cut-off, and full correlation was also seen between the MLST and MLVA-8<sub>Orsay</sub> complexes, i.e., ST-2 with A, ST-80 with B, ST-15 with C, and ST-3 with D (Figures 1 and 3).

MLVA-8<sub>Orsay</sub> L markers are very useful for establishing phylogenetic relationships because of their stability [10], and reveal relationships similar to those provided by MLST analysis [12,20]. To date, several criteria for the formation of MLVA complexes using L and S markers have been proposed for *A. baumannii* [10,11]. Agreement has been achieved with the interpretation of L markers but no consensus has been reached with respect to S markers, -something already achieved for other pathogens [21]- specifically with the maximum number of allele and repeat differences that can be accepted to

cluster different MLVA types into the same MLVA complex.

The 15 studied PFGE types all showed XDR. Indeed, three (EE1, EE10 and EE15) of the four PFGE types involved in the three outbreaks described in the present work, were also resistant to imipenem. Resistance is common in *A. baumannii* nosocomial outbreaks since resistant strains are selected for in hospital environments, especially in high risk areas such as ICUs [4,22]. Other PFGE types resistant to imipenem, endemic but not involved in any outbreak, were detected in the present study, such as EE9 and EE11. Both showed a wide distribution across several areas of the hospital, and were isolated over long time periods (Figures 1 and 2). EE9 was isolated from 2005 to 2008 on the third, fourth, and fifth floors, and EE11 was isolated over 2003–2007 and during 2009 from the same floors as EE9, in addition to the ICU, emergency room, and out-patient clinic consultation rooms.

The susceptibility and  $\beta$ -lactamase results fitted well with the epidemiological data for Spain, where the resistance of *A. baumannii* to carbapenems is basically due to the activity of OXA-40 and OXA-58 [23]. OXA-23 activity has been commonly reported around the world, but only recently reported for *A. baumannii* in Spain [24]. The idea that interhospital transmission of XDR *A. baumannii* clones occurs is reinforced by the detection of a common pattern for the ADC, OXA-51, and CHOs genes, and their associated ISs, for example as seen in PFGE type pairs EE11 and Ab54, and EE9 and Ab9.

## Conclusions

The comparison of the three genotyping methods shows that MLST is very useful in global *A. baumannii* clonal studies, clustering the isolates into big clones. Though laborious, PFGE provides essential information in local studies of *A. baumannii* outbreaks. Currently, MLVA-8<sub>Orsay</sub> L markers provide similar information than MLST, but it has the drawback that no consensus has been reached regarding the interpretation of S markers. MLVA-8<sub>Orsay</sub> could be a better typing method than PFGE for *A. baumannii* if new S markers were added to MLVA panel and agreed criteria for MLVA clustering were established.

In the present study, the most prevalent was international clone II (ST-2), followed by international clone III (ST-3), ST-15 and ST-80. The period 1999–2004 was characterized by the predominant presence of international clone II. The period 2005–2010, however, saw diversification, with the increasing presence of international clone III (ST-3), ST-15 and ST-80. Extensively drug-resistance was universal and the genes providing resistance to carbapenems were *bla*<sub>OXA-58-like</sub> and *bla*<sub>OXA-40-like</sub>. The finding of the same  $\beta$ -lactamase

pattern in PFGE type pairs EE9 and Ab9, and EE11 and Ab54, suggests the interhospital transmission of the XDR *A. baumannii* clones ST-80 and ST-15. Finally, this study highlights that the endemic presence of extremely resistant PFGE types poses a potential risk for future outbreaks [25]. The present results also confirm the persistence of fifteen endemic PFGE types in a tertiary care hospital and the involvement of four of them in three outbreaks.

## Methods

### PFGE-typed strains and study design

The bacteria examined were 405 not previously studied *A. baumannii-calcoaceticus* complex isolates from a 285-bed public tertiary care hospital in the southeast of Spain; all were collected over the period 1999–2010 (both sporadically and during epidemic situations) and were sent to the Spanish National Center for Microbiology for their molecular characterization. Table 3 shows the distribution by year, sample type, and hospital ward of isolation for all 405 isolates.

The clinical samples were taken as part of standard patient care and also for this purpose, the bacterial strains were sent to a public national reference laboratory for their clonal analysis. This study focused on bacteria and no identifiable human data were used, therefore ethical approval was exempted.

All the isolates were analyzed by PFGE. All distinguishable PFGE patterns were interpreted as different PFGE types. Clustering was determined by using the unweighted-pair group method with arithmetic averages (UPGMA) and by using Dice's coefficient. The tolerance was set at 0.8% and the optimization at 1.5%. All calculations were performed by using InfoQuest software (Applied

Maths, Saint-Marten-Latem, Belgium). The PFGE types that were suspected of being endemic or epidemic were selected for further study. The selection criterion was based on the number of isolates and the genetic similarity; i.e., PFGE types that had  $\geq 5$  isolates, and PFGE types that although had  $< 5$  isolates showed  $\geq 85\%$  genetic similarity with the former PFGE types. A cut-off of 75% was subsequently chosen for clustering the selected PFGE types into big clones. The member isolates ( $N = 231$ ) were identified as *A. baumannii* by *bla*<sub>OXA-51-like</sub> gene amplification [26], analyzed by MLST and MLVA, tested for antimicrobial susceptibility, and examined for  $\beta$ -lactamase genes and their commonly associated ISs. The origin of the selected isolates was environmental ( $n = 52$ ) and clinical ( $n = 179$ , one isolate per patient).

### MLST and MLVA

MLST analysis was performed following the protocol of the Institute Pasteur ([www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Abaumannii.html](http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Abaumannii.html)). The *cpn60*, *fusA*, *gltA*, *pyrG*, *recA*, *rplB* and *rpoB* genes were amplified using the PCR conditions described by Bartual [8], and then sequenced. The primers used to amplify the genes were those described in the above-mentioned protocol, except the primers used for *rpoB*, which were those reported in earlier work [13]. Each allelic profile was assigned a ST.

MLVA typing was performed using the MLVA-8<sub>Orsay</sub> method [10], i.e., involving four L markers (Abaum\_3530, Abaum\_3002, Abaum\_2240, and Abaum\_1988) with large repeat units of  $\geq 9$  bp (minisatellites), and four S markers (Abaum\_0826, Abaum\_0845, Abaum\_2396, and Abaum\_3468) with small repeat units in the 2–8 bp range (microsatellites). For each VNTR locus, the alleles were sequenced and the length of the repeat and

**Table 3 Distribution of the 405 *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex isolates recovered over the twelve-year study period**

Year <sup>a</sup>	1999 (1/7)	2000 (28/52)	2001 (14/18)	2002 (35/50)	2003 (22/37)	2004 (9/35)
	2005 (30/35)	2006 (35/46)	2007 (32/50)	2008 (9/23)	2009 (7/26)	2010 (9/26)
Type of sample <sup>b,c</sup>	Respiratory (73/152)	Wound (39/69)	Environmental <sup>f</sup> (52/55)	Exudates colonization screening (34/51)		
	Urine (14/32)	Blood (11/20)	Not informed (0/17)	Catheter tip (5/5)	Other clinical samples (3/4)	
Hospital ward <sup>d,h</sup>	3rd Floor: IM <sup>d</sup> (115/181)	ICU (44/53)				
	4th Floor: IM, and General and Digestive Surgery (21/49)	Out-patient consultation rooms (15/41)				
	5th Floor: IM (22/38)	Emergency Room (9/19)				
	Not informed (2/18)	1st Floor-Pediatrics-Gynecology (0/2)				
	2nd Floor: Orthopedic Surgery-Mental Health (2/2)	Surgery Room (1/1)				
	Hemodialysis (0/1)					

<sup>a</sup>In parenthesis are indicated the number of endemic-epidemic *A. baumannii* isolates in the total number of *A. baumannii-calcoaceticus* complex isolates.

<sup>b</sup>Distributions are ordered from most to least frequent in relation to the total number of isolates.

<sup>c</sup>Types of environmental samples ( $N=55$ ): not informed ( $n=16$ ), nursing trolley (10), bed (6), door (4), telephone (4), electric panel (3), breathing equipment (3), monitor (3), closet (3), oxygen equipment (2), table (1).

<sup>d</sup>IM: Internal Medicine.

number of repetitions analyzed using the Tandem Repeats Finder tool (<http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>). The number of repeats was calculated by rounding up according to Vergnaud [21]. MLVA clustering was represented using a minimum spanning tree produced using InfoQuest software (Applied Maths, Saint-Martens-Latem, Belgium).

The comparison of the discriminatory power of the PFGE, MLST, and MLVA typing techniques was done calculating the Hunter-Gaston diversity index (HGDI) [14] with a 95% confidence interval [27]. The MLVA polymorphism index was calculated for individual and combined VNTR loci.

#### Antimicrobial susceptibility, $\beta$ -lactamase genes and insertion sequences

Susceptibility testing was performed using the MicroScan NM31 microdilution method (Dade Behring, West Sacramento, CA, USA). Disc diffusion was used to determine susceptibility to doxycycline, minocycline and colistin (all from Oxoid, Basingstoke, Hants, UK). Imipenem susceptibility was confirmed using E-test strips (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France). Results were interpreted using the Clinical Laboratory Standards Institute criteria for *Acinetobacter* spp. The control strains used were *E. coli* ATCC 25922 and *E. coli* ATCC 35218.

Screening for the ADC genes [28], and the four CHO genes [29] *bla*<sub>OXA-51-like</sub>, *bla*<sub>OXA-23-like</sub>, *bla*<sub>OXA-40-like</sub> and *bla*<sub>OXA-58-like</sub> as well as their most commonly associated ISs (*ISAb1*, *ISAb2*, *ISAb3*, *ISAb4* and *IS18*), was performed. Screening was also undertaken for the MBL genes [30] *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>SIM-1</sub>, *bla*<sub>GIM-1</sub>, *bla*<sub>SPM-1</sub> and *bla*<sub>NDM-1</sub> [31]. The PCR methods used were those described in previous work [23].

#### Sequencing analysis

Purification of the PCR products was performed using the illustra™ ExoProStar™ 1-Step Kit (GE Healthcare, NJ, USA). Sequencing was performed in a 3730XL sequencer using the BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v.3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The sequences were assembled using Lasergene SeqMan II software (DNA Star, Inc., Madison, Wis., USA).

#### Interhospital comparison of PFGE types

Two epidemic PFGE types, Ab54 and Ab9, that had been previously described from other Spanish hospitals [13], were added to the study. In 2003, Ab54 caused an outbreak in the intensive care unit (ICU) of a hospital in the Province of Almería (where the studied hospital is also located). In 2005, Ab9 was involved in two outbreaks in the ICUs of two different hospitals in the same southwestern province of Spain (Badajoz). Ab54 was included to the study for comparison with EE11 since both shared ST-15. Ab9 was included for comparison with

EE9 since both share ST-80. The interhospital comparison of these four PFGE types included PFGE, MLST, and MLVA typing; as well as the analysis of ADC, OXA-51, CHO, MBL genes and associated ISs.

#### Abbreviations

PFGE: Pulsed-field gel electrophoresis; MLST: Multilocus sequence typing; VNTR: Variable number tandem repeat; MLVA: Multiple locus variable number tandem repeat sequence (VNTR) analysis; ST: Sequence type; L: Large; S: Small; MDR: Multidrug-resistant; XDR: Extensively drug-resistant; HGDI: Hunter-Gaston diversity index; MIC: Minimum inhibitory concentration; CHO: Carbapenem hydrolyzing oxacillinase; MBL: Metallobeta-lactamase; ADC: *Acinetobacter*-derived cephalosporinase; IS: Insertion sequence; 2 F: Second floor; 3 F: Third floor; 4 F: Fourth floor; 5 F: Fifth floor; ICU: Intensive care unit; SR: Surgery room; ER: Emergency room; OC: Out-patient clinic consultation room.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

#### Authors' contributions

PV contributed to the study design, the acquisition, analysis and interpretation of data, and drafting the manuscript. SV, AV and JAS contributed to the study design, the interpretation of data and revising the manuscript. TC contributed to the acquisition of data. NG, MO and MJM contributed to the PFGE, MLST and MLVA analysis. All the authors have read and approved the final draft before submission to BMC Microbiology.

#### Acknowledgements

We thank Adrian Burton for editing and language assistance (Physical Evidence Scientific Translations; <http://physicalevidence.es/english/welcome>), and Dr. María Ángeles Lucerna (Preventive Medicine Unit, Hospital de Poniente, El Ejido, Almería) for providing the nosocomial outbreak data.

#### Author details

<sup>1</sup>Laboratorio de Taxonomía, Servicio de Bacteriología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda-Pozuelo km2, 28220 Madrid, Majadahonda, Spain. <sup>2</sup>Laboratorio de Biotecnología Hospital de Poniente El Ejido, Almería, Spain. <sup>3</sup>Laboratorio de Infecciones Intrahospitalarias Servicio de Bacteriología, Centro Nacional de Microbiología Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain.

Received: 30 September 2014 Accepted: 11 February 2015

Published online: 25 February 2015

#### References

- Gayoso CM, Mateos J, Méndez JA, Fernández-Puente P, Rumbo C, Tomás M, et al. Molecular mechanisms involved in the response to desiccation stress and persistence in *Acinetobacter baumannii*. *J Proteome Res*. 2013. doi:10.1021/pr400603f.
- Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emerging of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21:835–82.
- Higgins PG, Dammhayn C, Hackel M, Seifert H. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65:233–B.
- Villegas MV, Hartstein AI. *Acinetobacter* outbreaks, 1977–2000. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2003;24:284–95.
- Towner KJ. *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. *J Hosp Infect*. 2009;73:355–63.
- 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;43:4328–55.
- 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;48:2476–83.

8. Bartual S, Seifert H, Hippler C, Domínguez MA, Wisplinghoff H, Rodríguez-Valera F. Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol. 2005;43:4382–90.
9. 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. 2010;5:e10034.
10. Pourcel C, Minandri F, Hauck Y, D'Arezzo S, Imperi F, Vergnaud G, 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. 2011;49:539–48.
11. Hu Y, Li B, Jin D, Cui Z, Tao X, Zhang B, et al. Comparison of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis with pulsed-field gel electrophoresis typing of *Acinetobacter baumannii* in China. J Clin Microbiol. 2013;51:1263–8.
12. Hauck Y, Soler C, Jault P, Mérens A, G erome P, Mac Nab C, et al. Diversity of *Acinetobacter baumannii* in four French military hospitals, as assessed by multiple locus variable number of tandem repeat analysis. PLoS One. 2012;7:e44597.
13. Villalón P, Valdezate S, Medina-Pascual MJ, Rubio V, Vindel A, Saez-Nieto JA. Clonal diversity of nosocomial epidemic *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Spain. J Clin Microbiol. 2011;49:875–82.
14. Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. J Clin Microbiol. 1998;26:2465–6.
15. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect. 2012;18:268–81.
16. Di Popolo A, Giannouli M, Triassi M, Brisse S, Zarrilli R. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in four Mediterranean countries using a multilocus sequencing typing scheme. Clin Microbiol Infect. 2011;17:197–201.
17. Martins N, Dalla-Costa L, Uehara AA, Riley LW, Moreira BM. Emergence of *Acinetobacter baumannii* international clone II in Brazil: reflection of a global expansion. Infect Genet Evol. 2013;20:378–80.
18. Hojabri Z, Pajand O, Bonura C, Aleo A, Giammanco A, Mammina C. Molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* in Iran: endemic and epidemic spread of multiresistant isolates. J Antimicrob Chemother. 2014. doi:10.1093.
19. Van Dessel H, Dijkshoorn L, van der Reijden T, Bakker N, Paauw A, van den Broek P, et al. Identification of a new geographically widespread multiresistant *Acinetobacter baumannii* clone from European hospitals. Res Microbiol. 2004;155:105–12.
20. Maiden MCJ. Multilocus sequence typing of bacteria. Annu Rev Microbiol. 2006;60:561–88.
21. Vergnaud G, Pourcel C. Multiple locus variable number of tandem repeats analysis. Methods Mol Biol. 2009;551:141–58.
22. Playford EG, Craig JC, Iredell JR. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in intensive care unit patients: risk factors for acquisition, infection and their consequences. J Hosp Infect. 2007;65:204–11.
23. Villalón P, Valdezate S, Medina-Pascual MJ, Carrasco G, Vindel A, Saez-Nieto JA. Epidemiology of the *Acinetobacter*-derived cephalosporinase, carbapenem-hydrolysing oxacillinase and metallo- $\beta$ -lactamase genes, and of common insertion sequences, in epidemic clones of *Acinetobacter baumannii* from Spain. J Antimicrob Chemother. 2013;68:550–3.
24. Mosqueda N, Espinal P, Cosgaya C, Viota S, Plasencia V, Alvarez-Lerma F, et al. Globally expanding carbapenemase finally appears in Spain: nosocomial outbreak of *Acinetobacter baumannii* producing plasmid-encoded OXA-23 in Barcelona. Spain Antimicrob Agents Chemother. 2013;57:5155–7.
25. Koeleman JGM, van der Bijl MW, Stoof J, Vandenbroucke-Grauls CMJ, Savelkoul PHM. Antibiotic resistance is a major risk factor for epidemic behavior of *Acinetobacter baumannii*. Infect Control Hosp Epidemiol. 2001;22:284–8.
26. Pournaras S, Gogou V, Giannouli M, Dimitroulia E, Dafopoulou K, Tsakris A, et al. Single-locus-sequence-based typing of *bla*<sub>OXA-51-like</sub> genes for rapid assignment of *acinetobacter baumannii* clinical isolates to international clonal lineages. J Clin Microbiol. 2014;52:1653–7.
27. Grundmann H, Hori S, Tanner G. Determining confidence intervals when measuring genetic diversity and the discriminatory abilities of typing methods for microorganisms. J Clin Microbiol. 2001;39:4190–2.
28. Bou G, Martínez-Beltrán J. Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an Amp<sup>C</sup>  $\beta$ -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44:428–32.
29. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. Int J Antimicrob Agents. 2006;27:351–3.
30. Ellington MJ, Kistler J, Livermore DM, Woodford N. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo- $\beta$ -lactamases. J Antimicrob Chemother. 2007;59:321–2.
31. Chen Y, Zhou Z, Jiang Y, Yu Y. Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in China. J Antimicrob Chemother. 2011;66:1255–9.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)





# DISCUSIÓN

---



En esta memoria se incluyen cuatro artículos de investigación que exponen diferentes situaciones epidemiológicas referentes a la infección nosocomial por *A. baumannii*. Los dos primeros artículos están realizados sobre una amplia población de aislados epidémicos procedentes de diferentes hospitales de España durante un largo periodo de tiempo. El artículo 1 [Villalón, 2011] es un estudio de tipificación molecular de clones epidémicos y el artículo 2 [Villalón, 2013] es un estudio acerca de los determinantes genéticos de  $\beta$ -lactamasas presentes en esos clones. El artículo 3 [Monterrubbio-Villar, 2009] es un estudio clínico-epidemiológico de un brote detectado en la UCI de un hospital. El artículo 4 [Villalón, 2015] se centra en la tipificación molecular de los clones endémicos y epidémicos presentes en un único hospital durante un extenso periodo de tiempo, y en la comparación con otros clones epidémicos circulantes en España.

Estos cuatro artículos se entrelazan por su contenido y tienen como hilo conductor principal la caracterización molecular de las cepas epidémicas nosocomiales de *A. baumannii*. La investigación clonal realizada en el artículo 1 sentó las bases para poder abordar el artículo 2 sobre mecanismos de resistencia. El brote analizado en el artículo 3 también está incluido en los análisis de los artículos 1 y 2. Para finalizar, las investigaciones de los artículos 1 y 2 también han sido fundamentales para poder realizar la comparación interhospitalaria con los clones analizados en el artículo 4.

La discusión de los cuatro artículos mencionados, que a continuación se expone, está estructurada de forma que, a la par que se va analizando cada artículo de forma individual, se van relacionando entre ellos para formar un conjunto integrado de conocimiento.

## **1. Artículo 1: Diversidad clonal de las cepas epidémicas nosocomiales de *Acinetobacter baumannii* aisladas en España**

En este trabajo se estudió una amplia población de cepas (814) de origen clínico del complejo Abc recibidas en el Centro Nacional de Microbiología (CNM) para su caracterización molecular. Estas cepas fueron aisladas durante situaciones de brote en 19 hospitales (H1-H19) del Sistema Nacional de Salud español durante un periodo de 11 años. Los hospitales participantes estaban situados en 17 provincias distintas, implicando un reparto representativo de la geografía española.

La mayoría de las cepas procedían de unidades hospitalarias de cuidado al paciente crítico; como unidades de quemados, postquirúrgicas y, sobre todo, de cuidados intensivos; y como es habitual en este tipo de estudios, la mayoría de los aislados provenían de muestras respiratorias (tabla 1, artículo 1) [Falagas, 2007]. El paciente crítico presenta muchos factores de riesgo que lo hacen especialmente vulnerable a la infección por *A. baumannii*, entre los que destacan intervenciones invasivas como la intubación respiratoria que supone una vía de entrada de patógenos nosocomiales [Coelho, 2006].

Como para muchas otras especies bacterianas, el PFGE es considerado el método de tipificación con mayor poder de discriminación para *A. baumannii* [Marcos, 1994; Seifer, 1995]. Este trabajo se inició con el análisis por PFGE de todas las cepas del estudio, obteniéndose 58 PFGE tipos epidémicos (Ab1-Ab58).

Los PFGE tipos se distribuyeron en 16 clones en función de su similitud genética (punto de corte del 80%): grupo A (clones A1 y A2), clon B, clon C, grupo D (clones D1-D7), clon E, clon F y grupo G (clones G1-G3), (figura 1, artículo 1). El poder discriminativo de esta técnica se determinó con el índice de diversidad (ID) de Simpson (0,95) [Hunter, 1998] que mostró que el PFGE es una herramienta eficaz para determinar las relaciones genéticas entre las cepas aisladas en brotes epidémicos. El PFGE también fue útil para determinar la implicación de las cepas en distintas situaciones epidemiológicas [van Belkum, 2007], tal y como se describe a continuación.

La distribución clonal de los PFGE tipos en los hospitales reveló dos **modelos de brotes**: monoclonal y policlonal (tabla 1 y figura 1, artículo 1). El **modelo monoclonal** fue el más común, detectándose en 15 de 19 hospitales. Los brotes monoclonales fueron en ocasiones causados por un solo PFGE tipo epidémico (seis hospitales), pero también por varios PFGE tipos pertenecientes a un mismo clon (ocho hospitales). En este último caso de modelo monoclonal se observó que normalmente prevalecía un PFGE tipo sobre los otros; es decir, un PFGE tipo estaba presente en la mayoría de los aislados y además estaban presentes otros PFGE tipos minoritarios. El hospital H7 también se ajustó al modelo monoclonal aunque con una peculiaridad: presentaba distintos clones (D4, D1 y A2) que causaron cuatro brotes monoclonales independientes en distintas fechas.

El **modelo policlonal** concernió sólo a cuatro hospitales (H3, H4, H18 y H19). En los hospitales H3 y H4, uno de los clones coexistentes era claramente minoritario. En ambos casos, los clones minoritarios presentaron resistencia a imipenem. Esto podría reflejar la coexistencia de clones epidémicos con clones esporádicos multirresistentes [Rodríguez-Baño, 2004]. Estos últimos supondrían un factor de riesgo para la aparición de nuevos brotes. El hospital H19 también exhibió un patrón policlonal con tres clones (D1, D5 y G3) aislados en la UCI, cardiología, traumatología y consultas externas; lo que podría reflejar un bajo nivel en el control de la infección nosocomial, teniendo como consecuencia la diseminación intrahospitalaria de algunos clones (D1 y D5) por un sospechado mecanismo de contaminación cruzada [Marcos, 1994]. Desafortunadamente, el origen del brote fue desconocido. Por último, el hospital H18 presentó un brote policlonal con clones epidémicos y esporádicos coexistentes, pero debido a la falta de mayor información, no fue posible hacer un análisis epidemiológico más profundo.

La **distribución temporal** de los 58 PFGE tipos reveló que todos ellos estaban implicados en **brotes**, aunque además algunos mostraron **persistencia** en el tiempo en algunas unidades hospitalarias. Por ejemplo, en el hospital H7 se detectó el clon D4 en dos periodos separados por un intervalo de más de cuatro años. De manera similar, en el hospital H18 se aisló el clon D7 en dos brotes diferentes en 2001 y 2006. La reaparición en estos dos hospitales de clones epidémicos previamente aislados, revela la persistencia endémica de cepas de *A.*

*baumannii* en el ambiente nosocomial, donde representan un factor de riesgo para futuros brotes.

La **transmisión interhospitalaria** de *A. baumannii* es un hecho conocido [Barbolla 2003; Coelho, 2006; Maragakis, 2008]. El presente estudio apunta hacia este dato al analizar la distribución temporal de los PFGE tipos en los clones B y D6. El clon B fue exclusivo de los hospitales H4 y H5, ambos situados en la misma provincia P3. La similitud genética de los PFGE tipos fue muy elevada (87 al 100%), incluso ambos hospitales compartieron el PFGE tipo Ab9. Este PFGE tipo (Ab9) se detectó por primera vez en el hospital H4 en junio del 2005 de forma minoritaria. En el hospital H5, Ab9 se detectó en julio del 2005, y fue el PFGE tipo mayoritario aislado en este hospital [Monterrubio-Villar, 2009]. Estos datos apuntan hacia la transmisión de Ab9 desde el hospital H4 hacia el hospital H5, originando un nuevo brote en este último hospital. Una posible explicación, aunque no confirmada, para este hecho podría ser la transferencia de pacientes y/o trabajadores sanitarios de un hospital a otro, lo que estaría favorecido por la pertenencia de ambos hospitales al mismo área de salud. De forma similar, los PFGE tipos del clon D6 (Ab49, Ab50 y Ab51) se distribuyeron exclusivamente en los hospitales H1 y H2 de la provincia P1. Aunque estos dos hospitales no compartían ningún PFGE tipo, sí compartían el mismo clon D6. Este dato también podría indicar la transmisión interhospitalaria de la bacteria.

Una característica que presentan los aislados de *A. baumannii* implicados en brotes nosocomiales es la **multirresistencia** [Fierobe, 2001; Wang, 2003]. En

este trabajo, las pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos mostraron que el fenotipo multirresistente era una característica común a todos los PFGE tipos epidémicos, además presentando la mayoría de ellos resistencia a imipenem (74,6%). En la valoración de estas pruebas, las CMIs y halos de inhibición intermedios se interpretaron como resistentes. La primera elección en el tratamiento de la infección por *A. baumannii* resistente a carbapenémicos es la colistina. Este organismo presenta un nivel bajo de resistencia a este agente; de hecho, en este estudio es el único antibiótico para el que se observó sensibilidad en todos los aislados.

La **secuenciación del gen *rpoB*** se hizo con fines epidemiológicos y taxonómicos. Por un lado, el motivo era obtener un marcador de cribado que pudiera ofrecer resultados más rápidos en el análisis de los brotes. En este aspecto, aunque los cinco *rpoB* tipos (figura 1, artículo 1) mostraron una distribución clonal correlacionada con los PFGE tipos (un clon se correspondía con un *rpoB* tipo), el poder discriminativo de esta técnica no fue elevado (ID de 0,45). En cuanto al interés taxonómico, hay que considerar que las pruebas bioquímicas convencionales no son capaces de identificar *A. baumannii* con total seguridad y en la mayoría de los casos, se limitan a clasificar los aislados de esta especie en el complejo Abc. Las pruebas bioquímicas son habitualmente la única herramienta de identificación disponible en los laboratorios de microbiología clínica de los hospitales. Los aislados incluidos en este estudio habían sido presuntivamente identificados en los hospitales de origen como *A. baumannii* o

como pertenecientes al complejo Abc. En este contexto, la secuenciación parcial del gen *rpoB* es una **herramienta útil para identificar las bacterias a nivel de especie** [Ko, 2007; La Scola, 2006] ya que todos los PFGE tipos fueron identificados como *A. baumannii* empleando esta técnica.

El análisis **MLST** de las cepas epidémicas ofreció siete STs (figura 1, artículo 1) con una distribución clonal que se correlacionaba con los PFGE tipos (un clon se correspondía con un ST), aunque tampoco mostró un poder discriminativo elevado teniendo en cuenta que el ID fue 0,48. Las relaciones clonales internacionales se hicieron de acuerdo a un análisis descrito previamente [Diancourt, 2010].

El **ST-2** se corresponde con el **clon internacional II**. Se ha descrito como el ST más común en los países mediterráneos [Denton, 2009; Di Popolo, 2010; Giannouli, 2010] y también fue el más prevalente en este estudio (47,5%). El ST-2 fue compartido por todos los clones del grupo D (D1-D7), que a su vez presentaron una amplia distribución en el conjunto de provincias incluidas en el estudio durante 1997-2007, abarcando más del 50% de los aislados en ese periodo (figura 2, artículo 1).

El **ST-3** (5,1%) se corresponde con el **clon internacional III** y se detectó en el grupo clonal G (G1-G3). Los clones de este grupo, aunque minoritarios, tuvieron una distribución temporal esporádica a través del periodo de estudio (detectados en 2000, 2001 y 2007) y mostraron una distribución geográfica aleatoria.

El ST-15 (1,7%) y el ST-32 (1,7%) tuvieron distribuciones geográficas y temporales limitadas.

Los secuenciotipos ST-79, ST-80 y ST-81 fueron descritos por primera vez en este trabajo. El **ST-81** (10,2%) difiere del ST-1 en un solo alelo. Por tanto, forma parte del **complejo clonal 1**, que a su vez incluye el clon internacional I. El ST-81 estaba presente en el clon C y tuvo un número de aislados significativo en 1999-2002 en el NE de España, pero posteriormente no volvió a detectarse. El **ST-79** (13,6%) presentó dos alelos de nueva descripción (*cpn60-26* y *recA29*) y se detectó en el grupo clonal A (A1 y A2). Los clones del grupo A se aislaron por primera vez en la provincia P6 en el 2004 como clones minoritarios. Desde el 2005, el número de aislados de clones del grupo A aumentó, extendiéndose a otras provincias. El **ST-80** (20,3%), una nueva combinación de alelos previamente descritos, se detectó en los aislados del clon B. Solamente se detectó en la provincia P3 durante 2005-2007 y está implicado en la transmisión interhospitalaria de *A. baumannii* (del hospital H4 al H5). El ST-79 y el ST-80 podrían ser clones nuevos emergentes en proceso de expansión. Se debería hacer un seguimiento por MLST de ambos STs para determinar su evolución.

El complejo clonal internacional 1 (ST-81), el clon internacional II (ST-2) y el clon internacional III (ST-3) se han asociado reiteradamente con aislados multirresistentes [Dijkshoorn, 1996; Di Popolo, 2010; Giannouli, 2010; Peleg, 2008; van Dessel, 2004]. Los aislados sensibles a imipenem no presentaron una distribución homogénea entre todos los clones, sino una distribución sesgada

(figura 1, artículo 1) en el grupo de clones A (ST-79), el clon C (ST-81), y los clones D3, D4 y D7 (todos ellos del ST-2). La distribución de la susceptibilidad a imipenem en el ST-2 y el ST-15 encaja bien con datos previamente informados [Diancourt, 2010]. En el momento de la realización de este estudio, para el ST-2 había datos sensibles y resistentes, y para el ST-15 sólo había informes resistentes. El ST-3, el ST-32 y el ST-81, previamente descritos como sensibles a imipenem [Diancourt, 2010], en este trabajo fueron resistentes. El ST-79 y el ST-80 fueron descritos por primera vez en este estudio y por tanto, no había datos previos para comparar. Sin embargo, como se verá en la discusión del artículo 4 de esta memoria, el ST-80 multirresistente se detectará posteriormente en otra población de aislados nosocomiales de *A. baumannii* [Villalón, 2015].

El estudio de la variabilidad genética de las cepas de *A. baumannii* aporta un conocimiento en profundidad de su epidemiología. Muchos hospitales han incluido este análisis entre las medidas a tomar para erradicar brotes [Denton, 2009; Giannouli, 2010; Monterrubio-Villar, 2009; Roberts, 2001]. Este trabajo evidencia que los estudios de tipificación aportan información de la **distribución temporal de los clones** en diferentes unidades hospitalarias y de **la complejidad clonal de los brotes**. Los resultados confirman que un clon puede reaparecer en diferentes momentos, sugiriendo su **persistencia endémica**. Los resultados también resaltan la **transmisión intra e internocomial de las bacterias**, reflejando de qué forma MDRAB se ha convertido en un problema hospitalario a nivel mundial.

## 2. Artículo 2: Epidemiología de los genes de las cefalosporinas derivadas de *Acinetobacter*, las oxacilinasas hidrolizadoras de carbapenémicos y las metalo- $\beta$ -lactamas, y de las secuencias de inserción comunes en los clones epidémicos de *Acinetobacter baumannii* en España

MDRAB es uno de los principales patógenos causantes de brotes en los hospitales [Peleg, 2008]. Los **carbapenémicos** son la primera elección en el tratamiento de infecciones graves por esta bacteria. Por este motivo decidimos llevar a cabo un trabajo de investigación sobre los principales determinantes genéticos de resistencia de este grupo de antimicrobianos en *A. baumannii*, que a día de hoy son fundamentales para administrar un tratamiento eficaz a los pacientes afectados.

La población de estudio en este trabajo la constituyeron los 58 PFGE tipos epidémicos de *A. baumannii* que habían sido objeto de análisis clonal en el artículo 1 de esta memoria [Villalón, 2011]. Se trataba, por tanto, de una población representativa de los clones epidémicos de *A. baumannii* circulantes en España. Todos los PFGE tipos eran multirresistentes y sólo una minoría (25,4%) eran sensibles a imipenem (figura S1, artículo 2).

Las  **$\beta$ -lactamasas** son el mecanismo de resistencia a  $\beta$ -lactámicos más prevalente en *A. baumannii* [Peleg, 2008]. En este trabajo se estudiaron los genes de las cefalosporinas derivadas de *Acinetobacter* (ADCs) [Hujer, 2005], de los

principales grupos de oxacilinasas hidrolizadoras de carbapenémicos (CHOs): OXA-51 [Brown, 2005], OXA-23 [Corvec, 2007], OXA-40 [Bou, 2000-c] y OXA-58 [Poirel, 2005], y de las metalo- $\beta$ -lactamasas (MBLs) [Lee, 2005; Karthikeyan, 2010]. También se incluyó en el estudio la búsqueda de las secuencias de inserción (SIs) más frecuentemente asociadas a estos genes en *A. baumannii*: IS*Aba1*, IS*Aba2*, IS*Aba3*, IS*Aba4* e IS18 [Héritier, 2006; Turton, 2006].

El análisis de **MBLs** comprendía el estudio del fenotipo y del genotipo. La detección del fenotipo con tiras de E-test de imipenem *vs.* imipenem+EDTA mostró un fenotipo positivo para MBLs en la mayoría de las cepas (67,8%). Sin embargo, estos resultados se interpretaron como probables falsos positivos debido a que ninguna cepa fue positiva en la amplificación por PCR para los genes *bla*<sub>MBL</sub> (*bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>GIM-1</sub>, *bla*<sub>SIM-1</sub>, *bla*<sub>SPM-1</sub> o *bla*<sub>NDM-1</sub>). Este fenómeno puede suceder en cepas MBL-negativas pero CHO-positivas, y una explicación posible es que, en presencia de EDTA, las oxacilinasas cambian a un estado menos activo, lo que llevaría a una reducción drástica de las CMIs (tabla 1, artículo 2) [Segal, 2005-a]. En este estudio también se observó que el efecto del EDTA fue mínimo en las cepas que sólo portaban el gen *bla*<sub>OXA-51-like</sub>, moderado en las que portaban el gen *bla*<sub>OXA-58-like</sub> y elevado en aquellas que tenían el gen *bla*<sub>OXA-40-like</sub>. Esto se debe a que cuanto más eficaz es la actividad de las CHOs, más evidente es la actividad sinérgica del imipenem+EDTA.

El análisis de **SIs** dejó patente que **IS*Aba1*** fue la SI detectada con mayor frecuencia (93,2% de las cepas), seguida de IS*Aba2*, IS*Aba3* e IS18. IS*Aba4*, sin

embargo, no se detectó en ninguna cepa. En cuanto a su localización, *ISAb1* siempre se encontró en posición río arriba de los genes *bla<sub>ADC</sub>* y *bla<sub>OXA-51-like</sub>*, incluso se detectaron dos secuencias distintas de *ISAb1* en 13 cepas; lo que muestra la gran capacidad de *ISAb1* de insertarse en distintos puntos del mismo genoma [Segal, 2005-b]. Finalmente, *ISAb2*, *ISAb3* e *IS18* se detectaron asociadas a *bla<sub>OXA-58-like</sub>*. En la figura S1 (artículo 2) se muestra la distribución clonal de las SIs analizadas y también su posición respecto a los genes estudiados.

Como era de esperar para un gen intrínseco en *A. baumannii*, *bla<sub>ADC</sub>* se detectó en todas las cepas. El análisis de los amplificadores permitió detectar 10 variantes alélicas (tabla 2, artículo 2), de las cuales cuatro fueron descritas por primera vez en este trabajo. Las distintas variantes alélicas mostraron una clara distribución clonal que se puede observar en la figura S1 (artículo 2). La sobreexpresión del gen *bla<sub>ADC</sub>* viene determinada por la inserción de *ISAb1* en posición río arriba [Héritier, 2006]. Sin embargo, no se observaron diferencias fenotípicas entre las cepas que presentaban *ISAb1* río arriba de *bla<sub>ADC</sub>* (n=54) y las que no lo presentaban (n=5). Tampoco hubo diferencias fenotípicas entre los distintos *ADC* tipos. Todas las cepas fueron resistentes a cefalosporinas de amplio espectro, lo que hace sospechar que pueda haber otros mecanismos de resistencia en juego, a parte de las  $\beta$ -lactamasas [Peleg, 2008].

El gen intrínseco *bla<sub>OXA-51-like</sub>* fue detectado en todas las cepas, presentando ocho variantes alélicas. La figura S1 (artículo 2) muestra la distribución clonal de las diferentes CHOs estudiadas y también las variantes alélicas *OXA-51*

detectadas. Estas variantes mostraron una distribución sesgada en los tres clones internacionales ya descrita con anterioridad [Evans, 2008]. La variante más común (45,8%) fue OXA-65/66/76/79, se denominó de esta manera por tener una secuencia común con OXA-65, OXA-66, OXA-76 y OXA-79, y estaba principalmente distribuida entre las cepas con ST-2 (clon internacional II). La variante OXA-69/92/112 (10,2% de las cepas) estaba asociada al ST-81 incluido en el complejo internacional 1. Finalmente, también se observó asociación entre OXA-71 y el ST-3 (clon internacional III).

El gen *bla*<sub>OXA-40-like</sub> fue el más prevalente (57,6% de las cepas) entre las CHOs adquiridas. Sólo mostró un alelo ampliamente distribuido entre los secuenciotipos ST-2, ST-3, ST-32, ST-79 y ST-80. Este hecho va en consonancia con la descripción en nuestro país de numerosos brotes ocasionados por cepas de *A. baumannii* portadoras de este gen [Bou, 2000-c; Acosta, 2011]. No se detectó ninguna SI asociada a *bla*<sub>OXA-40-like</sub>. Todas las cepas portadoras de este gen mostraron un alto nivel de resistencia a imipenem.

El gen *bla*<sub>OXA-58-like</sub> mostró una distribución menor, amplificando en el 20,3% de las cepas y también mostró sólo un alelo. Sin embargo, este gen aparecía siempre asociado a alguna SI [Poirel, 2006-b]. La combinación más frecuente fue IS*Aba2* en posición río arriba de *bla*<sub>OXA-58-like</sub> e IS*Aba3* río abajo, encontrándose en ocho PFGE tipos distribuidos entre el ST-15, el ST-79 y el ST-81. Otra combinación fue IS*Aba3* río abajo en un solo PFGE tipo en el ST-79. Y una tercera combinación fue la que presentaba sólo IS18 río arriba en tres PFGE tipos del clon

D6 (ST-2). Todas las cepas portadoras de *bla*<sub>OXA-58-like</sub> fueron resistentes a imipenem excepto Ab3 (figura S1, artículo 2). El elemento diferenciador entre Ab3 y el resto de las cepas portadoras de *bla*<sub>OXA-58-like</sub> es la ausencia en Ab3 de SIs río arriba de este gen. Esto podría ser un indicador indirecto del efecto potenciador de *ISAb<sub>a</sub>2* e *IS18* en la expresión de OXA-58.

El gen *bla*<sub>OXA-23-like</sub> no se detectó en ninguna de las cepas estudiadas. Aunque son numerosos los brotes descritos en todo el mundo por cepas de *A. baumannii* portadoras de este gen [Peleg, 2008], en el momento de la realización de este trabajo, *bla*<sub>OXA-23-like</sub> no se había detectado en ningún brote en España. Fue en 2013 cuando se describió el primer brote de cepas portadoras de *bla*<sub>OXA-23-like</sub> en nuestro país [Mosqueda, 2013].

Se observó sensibilidad a imipenem en el 25,4% de las cepas, con una distribución clonal en el ST-2, el ST-79 y el ST-81 (figura S1, artículo 2). La heterorresistencia a imipenem [Pournaras, 2005] fue un fenómeno frecuente (45,8% de las cepas) con una amplia distribución entre los distintos STs. Los valores altos de CMIs eran debidos a las CHOs adquiridas más que a la OXA-51 intrínseca. Igual que en un estudio previo [Héritier, 2005], las cepas portadoras de *bla*<sub>OXA-58-like</sub> fueron menos resistentes a imipenem (rango de CMIs de 4 a >32) que las cepas portadoras de *bla*<sub>OXA-40-like</sub> que presentaron un elevado nivel de resistencia (CMIs >32).

En cuanto a la distribución en los STs de los genes estudiados; el ST-2, que se corresponde con el clon internacional II [Diancourt, 2010], fue el más común

estando implicado en muchos brotes en 10 provincias españolas durante el periodo 1997-2007. También fue el más complejo, mostrando muchos perfiles genéticos (clones D1-D7 del PFGE) [Villalón, 2011]. Esta diversidad no se observó en el resto de los STs estudiados, probablemente por su menor representación numérica y/o su distribución geográfica y temporal más restringida. Todos los STs mostraron una clara distribución clonal de los genes *bla* y de sus SIs, igual que para la susceptibilidad a imipenem.

### **3. Artículo 3: Brote por *Acinetobacter baumannii* multirresistente en una unidad de cuidados intensivos polivalente: análisis clínico, epidemiológico y evolución de patrones del PFGE**

En este artículo se analizan las características clínicas y epidemiológicas de un brote en una UCI causado por varios PFGE tipos de MDRAB.

Durante las dos últimas décadas se han descrito numerosos brotes de MDRAB en distintas unidades hospitalarias, especialmente en UCIs de hospitales de tercer nivel y de hospitales universitarios [Das, 2002; Denton, 2004; Katragkou, 2006]. Los brotes por *A. baumannii* en hospitales comarcales se han informado con mucha menos frecuencia [Weernink, 1995]. Sin embargo, el brote que se describe en este trabajo tuvo lugar en la UCI de adultos de un hospital comarcal de 297 camas. La UCI tenía una actividad polivalente y capacidad para atender a ocho pacientes. Esta unidad no tuvo antecedentes epidémicos por *A. baumannii*, al menos durante los dos años previos al brote. En el año 2003 y durante los seis primeros meses del 2004, la incidencia de infección/colonización por *A. baumannii* fue baja, registrando valores del 2,4% y 2,2% respectivamente. Por añadidura, el año anterior a la detección del brote, desde julio del 2004 hasta junio del 2005, no se registró ningún caso de infección/colonización por esta bacteria. El perfil de resistencia a antimicrobianos durante este periodo previo al brote fue diferente y más sensible al que se registraría posteriormente. Todos los aislados detectados

antes del brote fueron sensibles a  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos y carbapenémicos.

El brote se extendió durante un periodo de **27 semanas**, desde julio del 2005 hasta enero del 2006. En julio del 2005 se aisló una cepa de MDRAB en las secreciones respiratorias de un paciente sometido a ventilación mecánica y que posteriormente sería reconocido como el caso índice del brote. A partir de esa fecha, el número de aislados de MDRAB fue en aumento hasta alcanzar un máximo (22) en agosto. Aunque en ligero declive, durante los tres meses siguientes todavía siguieron detectándose un número elevado de aislados (14). En la fase final del brote, durante los dos últimos meses, los aislados fueron disminuyendo progresivamente hasta desaparecer.

A lo largo de todo el proceso se aislaron **72 cepas de MDRAB**. Todos los aislados fueron de procedencia clínica. En este tipo de situaciones, los pacientes más vulnerables son los que presentan intubación traqueal [Peleg, 2008]. En este brote también se dio esta circunstancia, ya que el tipo de muestras en las que se aisló la bacteria, ordenadas de mayor a menor frecuencia, fue el siguiente: respiratorias (50%), punta de catéter (23,6%), sangre (13,9%), orina (6,9%) y heridas (5,6%). Otra característica de las cepas epidémicas de *A. baumannii* es la multirresistencia [Villalón, 2011], cualidad que también se observa en las cepas de este brote. Todos los aislados presentaron el mismo perfil de susceptibilidad a antimicrobianos, mostrando resistencia a todos los antibióticos estudiados, salvo **ampicilina/sulbactam y colistina**. De forma generalizada, también se detectó un

**nivel de resistencia a imipenem elevado** ya que el valor de las CMIs fue igual o superior a 16 µg/ml. Teniendo en cuenta estos datos, las distintas pautas de tratamiento administradas fueron a base de colistina y/o la combinación de ampicilina con sulbactam. La colistina se administró en aerosol y por vía intravenosa. Cinco pacientes no recibieron terapia antibiótica específica para tratar una infección por MDRAB.

Los pacientes afectados fueron 21, de los cuales fallecieron 13. La incidencia en la UCI por colonización/infección por *A. baumannii* durante el brote ascendió al 12,4%. El análisis de las características clínicas de los pacientes afectados se hizo teniendo en cuenta datos demográficos, la presencia y el estado de enfermedades crónicas, la gravedad de la enfermedad según la puntuación APACHE II, la presencia de factores de riesgo para la infección o colonización por patógenos nosocomiales, los datos microbiológicos y la evolución. Todas estas variables se analizaron y compararon entre supervivientes y no supervivientes. Diversos estudios indican que las infecciones por *A. baumannii* no van asociadas a peor pronóstico que el de otras infecciones o grupos de control [Garnacho-Montero, 2005; Álvarez-Lerma, 2005]. En este estudio se encontró una asociación positiva estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre la puntuación APACHE II el día del aislamiento del MDRAB y la mortalidad. Sin embargo, esta diferencia podría estar ocasionada por otros factores diferentes a la colonización o infección por MDRAB. Tampoco se observó que el desarrollo de choque séptico, ni la terapia antimicrobiana inapropiada estuvieran estadísticamente

asociados con la evolución fatal. Es muy difícil asegurar el impacto de la infección por *A. baumannii* en la mortalidad [Gordon, 2010], incluso cuando se utilizan herramientas de adecuadas, como el diseño de un estudio de casos y controles llevado a cabo en este trabajo.

Se enviaron 49 cepas de MDRAB al CNM para su tipificación molecular por **PFGE**. Las cepas se habían aislado en 18 de los 21 pacientes afectados, lo que suponía una selección representativa del brote. La tipificación por PFGE resultó ser una herramienta muy útil en la caracterización del brote [Seifert, 2005] y en su evolución temporal. Esta técnica agrupó los aislados en **cuatro genotipos (PFGE tipos) estrechamente relacionados**, ya que presentaban una similitud genética del 90-97%. El PFGE tipo 1 fue el primero en detectarse y el predominante (27 cepas). Los PFGE tipos 2, 3 y 4 se detectaron en 11, 3 y 8 cepas respectivamente (figura 1, artículo 3). A lo largo del periodo de 27 semanas de duración del brote, el PFGE tipo 1 se detectó durante las primeras 13 semanas, mientras que los PFGE tipos 2, 3 y 4 surgieron una, 13 y 18 semanas más tarde respectivamente. Algunos pacientes (8 de 18) tuvieron un único episodio provocado por MDRAB, mientras que otros(10 de 18) presentaron varios episodios a lo largo del brote con **aislamientos reiterados** de la bacteria. Entre estos últimos, cinco pacientes mostraron un solo PFGE tipo y los cinco pacientes restantes presentaron varios de los PFGE tipos descritos (figura 2, artículo 3). El caso más extremo fue el del paciente nº 8 que llegó a tener siete aislamientos en un periodo de más de dos meses, con la presencia de tres PFGE tipos distintos (1, 2 y 4). Los cuatro PFGE

tipos detectados en este brote probablemente son variantes de un ancestro común [Diancourt, 2010] generadas en un breve espacio de tiempo. Los cambios genéticos que llevan a la aparición de nuevos PFGE tipos podrían ocurrir tanto en el ambiente externo del hospital como en los tejidos de los pacientes colonizados/infectados.

Este análisis enlaza directamente con el **análisis de clonalidad** realizado en el artículo 1 [Villalón, 2011] y con el **análisis de  $\beta$ -lactamasas** del artículo 2 [Villalón, 2013]. El hospital donde tiene lugar el brote descrito en el presente artículo es el identificado como H5 en el artículo 1, y los PFGE tipos 1, 2, 3 y 4 identificados en el presente estudio se corresponden respectivamente con los PFGE tipos Ab9, Ab12, Ab14 y Ab15 del artículo 1. El análisis detallado del PFGE y del MLST nos ha permitido saber que se trata de un brote monoclonal (clon B, ST-80) con 4 PFGE tipos distintos y que uno de ellos (PFGE tipo 1 o Ab9) predomina inicialmente sobre los demás pero siendo sustituido posteriormente de una forma paulatina por nuevos PFGE tipos emergentes muy relacionados genéticamente. También hay importantes indicios de la transmisión de Ab9 del hospital H4 al H5, pertenecientes a la misma provincia P3. Aunque se desconoce cuál ha sido el mecanismo exacto de la transmisión interhospitalaria, en este hecho se encuentra el origen del brote en la UCI del hospital H5.

El análisis de determinantes genéticos de resistencia de  $\beta$ -lactamasas del artículo 2 mostró la siguiente combinación para los cuatro PFGE tipos implicados en este brote: *ISAb<sub>a</sub>1-ADC-1*, *OXA-64/99/132* y *OXA-40*. La presencia por sí sola

de *ISAbal* en posición río arriba de *ADC-1* explicaría la resistencia a cefalosporinas de amplio espectro [Héritier, 2006], al margen de que pueda haber otros mecanismos de resistencia adicionales que afecten a los  $\beta$ -lactámicos. El gen *bla*<sub>OXA-51-like</sub> presenta una secuencia compatible con las variantes *OXA-64*, *OXA-99* y *OXA-132*. La actividad carbapenemasa de *OXA-51* es residual y la sensibilidad a carbapenémicos no se ve afectada salvo que *bla*<sub>OXA-51-like</sub> experimente una sobreexpresión mediada por la inserción de *ISAbal* en posición río arriba [Segal, 2005-b], circunstancia que no se da en este caso. Sin embargo, debido a su alta actividad carbapenemasa, la presencia de *OXA-40* justifica por sí sola el alto nivel de resistencia a imipenem en las cepas de este brote. Como en la mayoría de los brotes de MDRAB descritos hasta el momento en España, el principal determinante de resistencia a carbapenémicos es *bla*<sub>OXA-40-like</sub> [Villalón, 2013].

*A. baumannii* es un microorganismo de gran importancia en la infección nosocomial debido a la variedad de sus reservorios, su capacidad para adquirir resistencia a antibióticos, su resistencia a la desecación, su tendencia a causar brotes y su complejidad epidemiológica. Su erradicación completa y la prevención de su diseminación pueden requerir múltiples intervenciones [Cefai, 1990]. En este caso, se llevaron a cabo una serie de **medidas de control de la infección** [Corbella, 2000; Garner, 1996] ejecutadas en dos fases que tuvieron como resultado la desaparición de nuevos aislados de *A. baumannii* durante los tres años siguientes. En la primera fase se contactó con los especialistas en

enfermedades infecciosas, se establecieron cohortes de pacientes infectados/colonizados y del personal de enfermería, se restringió el uso de carbapenémicos, se informó del brote a todo el personal de la UCI y se recalzó la necesidad de lavarse las manos con un gel con base de alcohol. En la segunda fase se establecieron medidas estrictas de barrera (uso de guantes y batas estériles, mascarillas y protección ocular), se limitaron el número de exploraciones clínicas y de visitas, y se limpiaron todas las superficies con hipoclorito al 0,1%. Finalmente, gracias a este programa multifactorial de control de la infección, basado también en la caracterización microbiológica por PFGE, se consiguió la erradicación definitiva del brote.

#### **4. Artículo 4: Clones endémicos y epidémicos de *Acinetobacter baumannii*: un estudio de doce años en un hospital de tercer nivel**

En este trabajo se realizó un análisis de la diversidad genética de los clones endémicos y epidémicos de *A. baumannii* aislados en un único hospital durante un periodo de doce años. Las técnicas de tipificación utilizadas fueron el PFGE, el MLST y el MLVA.

El análisis inicial incluyó todos los aislados del complejo Abc (405) recolectados en el hospital durante el periodo de estudio (1999-2010) (tabla 3, artículo 4). La tipificación clonal por PFGE de estos aislados identificó 15 PFGE tipos endémicos (EE1-EE15, 231 aislados) que fueron analizados por MLST y MLVA. Estos PFGE tipos se distribuyeron en cinco grupos en función de su similitud genética (punto de corte del 75%): EE1-EE8, EE9, EE10, EE11 y EE12-EE15 (figura 1, artículo 4).

Durante el periodo de estudio se registraron **tres brotes nosocomiales** por *A. baumannii* (figuras 1 y 2, artículo 4) en los que estuvieron implicados cuatro PFGE tipos epidémicos (EE1, EE10, EE13 y EE15). El primer brote tuvo lugar en 1999-2000 en el área de neumología de la 3ª planta del hospital, afectó a 20 pacientes y estuvieron implicados dos PFGE tipos (EE1 y EE15). Ambos PFGE tipos fueron detectados por primera vez durante el brote pero posteriormente persistieron de forma endémica en la 3ª planta hasta el año 2001. El segundo

brote ocurrió en la UCI en marzo del 2007, afectó a cuatro pacientes y fue causado por el PFGE tipo EE13. Este mismo PFGE tipo presentó una amplia distribución endémica en el hospital: fue reiteradamente aislado durante 2005-2009 en las plantas 3<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup> y 5<sup>a</sup>, así como en la UCI, urgencias y consultas externas. El tercer brote, de diciembre del 2009 a marzo del 2010, también sucedió en la UCI, fue provocado por el PFGE tipo EE10 y afectó a cuatro pacientes.

Los 11 PFGE tipos restantes (EE2-EE9, EE11, EE12 y EE14) no estuvieron implicados en ningún episodio epidémico pero fueron endémicos; es decir, fueron aislados en varias ocasiones en distintas partes del hospital. La **distribución temporal** de los 15 PFGE tipos fue variable, con un rango de 1-6 años, destacando la larga persistencia de EE9, EE13 y EE11 durante cuatro, cinco y seis años respectivamente. La **distribución espacial** en el hospital de los 15 PFGE tipos fue universal, aunque la 3<sup>a</sup> planta (113 aislados) y la UCI (44 aislados) fueron las unidades más afectadas, probablemente debido al tipo de actividad y de pacientes ingresados en esas áreas. Todos, salvo tres PFGE tipos (EE2, EE3 y EE10), fueron detectados en la 3<sup>a</sup> planta, y ocho de quince PFGE tipos fueron detectados en la UCI. Los PFGE tipos más ubicuos fueron EE8, EE11 y EE13. La persistencia a largo plazo, la amplia distribución en distintas áreas del hospital y la resistencia a antimicrobianos son factores de riesgo para la aparición de nuevos brotes. La figura 2 (artículo 4) muestra la distribución temporal y espacial de los 15 PFGE tipos endemo-epidémicos.

Los resultados del **MLST** se correlacionaron bien con el agrupamiento del PFGE. La mayoría de los PFGE tipos (60%; grupos EE1-EE8 y EE10) circulantes en el hospital durante el periodo de estudio presentaron el ST-2, correspondiente con el clon internacional II [Diancourt, 2010]. La detección de este clon de forma mayoritaria en los hospitales españoles es algo habitual [Villalón, 2011], igual que en otros países de la cuenca mediterránea [Di Popolo, 2011], además de en otras zonas del mundo [Martins, 2013; Hojabri, 2014]. En el artículo 1 de esta memoria [Villalón, 2011] se observó que el ST-2, de elevada prevalencia, agrupaba PFGE tipos que tenían patrones de bandas muy diferentes. Esta diversidad genética asociada al ST-2 también se detectó en el presente estudio, ya que los grupos EE1-EE8 y EE10 del PFGE presentaron entre ellos sólo un 65% de similitud genética. El ST-3 o clon internacional III [Diancourt, 2010] se correspondió con el grupo EE12-EE15 del PFGE. El clon internacional III también está implicado en muchos brotes nosocomiales a nivel mundial [van Dessel, 2004], y en este estudio fue el segundo más frecuente (26,7% de los PFGE tipos). Aunque el ST-15 (grupo EE11 del PFGE) y el ST-80 (grupo EE9 del PFGE) fueron los menos frecuentes (6,7% cada uno), ambos ya se habían descrito con anterioridad en brotes en otros hospitales españoles. En este estudio no se detectaron aislados del complejo clonal internacional 1/ST-81 ni de los secuenciotipos ST-79 y ST-32, aunque todos ellos son importantes clones nosocomiales previamente detectados en España [Villalón, 2011].

Tras obtener los resultados del MLST se decidió incorporar al estudio dos PFGE tipos epidémicos (Ab9 y Ab54) procedentes de otros hospitales españoles que habían sido previamente analizados por PFGE y MLST (artículos 1 y 3 de esta memoria) y para los que se habían estudiado los determinantes genéticos de  $\beta$ -lactamasas (artículo 2). En el 2005, Ab9 había sido detectado en dos brotes ocurridos en las UCIs de los hospitales H4 y H5 de la provincia de Badajoz. En el 2003, Ab54 se detectó en un brote en la UCI del hospital H3 situado en la provincia de Almería , donde también está ubicado el hospital del presente trabajo. Ab9 se incluyó para compararlo con EE9, ya que ambos compartían el ST-80. Ab54 se añadió al estudio para compararlo con EE11 porque ambos presentaban el ST-15. El estudio de comparación incluyó la tipificación por PFGE, MLST y MLVA, además del análisis de los genes de ADCs, CHOs, MBLs y las SIs asociadas (tabla 2 y figuras 1 y 3, artículo 4). El análisis del PFGE incluyó Ab9 en el mismo grupo clonal que EE9, y Ab54 en el mismo grupo que EE11.

El esquema **MLVA-8<sub>Orsay</sub>** ofreció una correlación perfecta entre los perfiles alélicos de los marcadores L y los STs obtenidos en el MLST. Por consiguiente, los marcadores L del MLVA-8<sub>Orsay</sub> se correlacionaron con el agrupamiento obtenido en el PFGE. Sirva como ilustración de la correlación perfecta entre los resultados de los marcadores L del MLVA y del MLST, el hecho de que el mismo perfil alélico de marcadores L (y por tanto, el mismo ST) se detectó incluso en PFGE tipos genéticamente dispares que pertenecían a grupos distintos; por ejemplo, el perfil de marcadores L 7-7-4-3 (ST-2) detectado en los grupos EE1-EE8 y EE10.

Los perfiles alélicos de los marcadores S mostraron una gran diversidad. Esta variabilidad se hace especialmente patente cuando el mismo PFGE tipo presenta distintos perfiles alélicos de marcadores S en poco tiempo [Hu, 2013]. Por ejemplo, EE4 registró un cambio en tres loci S entre los años 2000 y 2001, presentando por tanto dos MLVA tipos distintos. Por este motivo, en el PFGE tipo EE4 se identificaron EE4 y EE4\* que, aunque presentaban el mismo patrón de bandas, permitieron distinguir los aislados incluidos en cada uno de esos dos MLVA tipos. EE4 agrupaba los aislados del año 2000, y EE\* los del 2001 (figuras 1, 2 y 3; artículo 4). De forma similar, en el espacio de unos pocos meses y durante el brote acaecido en 2009-2010, el PFGE tipo EE10 experimentó cambios en dos loci S (identificados como EE10 y EE10\*). En uno de esos loci (alelo 0826), el cambio supuso un descenso notable en el número de repeticiones en tándem, pasando de 17 (en EE10, año 2009) a 9 (en EE10\*, año 2010). De hecho, la diversidad asociada al alelo 0826 ha llevado a algunos autores [Hu, 2013] a excluirlo a la hora de definir criterios de agrupación de los resultados en complejos MLVA. En este estudio, la variabilidad asociada a los marcadores S era tan grande que no fue posible definir criterios concretos para establecer complejos MLVA, ni tampoco para aplicar los criterios ya definidos por otros autores [Pourcel, 2011; Hu, 2013]. Por tanto, en este estudio los complejos MLVA, identificados como A, B, C y D, fueron definidos asumiendo un punto de corte de similitud genética del 40%. De esta forma se observó una correlación total entre el

MLST y los complejos MLVA-8<sup>Orsay</sup>: el ST-2 se correspondía con el complejo A, ST-80 con B, ST-15 con C, y ST-3 con D (figuras 1 y 3, artículo 4).

Los marcadores L del MLVA-8<sup>Orsay</sup> son muy útiles para establecer relaciones filogenéticas debido a su estabilidad [Pourcel, 2011], y revelan relaciones similares a las que aporta el análisis MLST [Hauck, 2012; Maiden, 2006]. Hasta hoy, se han propuesto para *A. baumannii* varios criterios para la formación de complejos MLVA teniendo en cuenta los marcadores L y S [Pourcel, 2011; Hu, 2013]. Hay unanimidad de criterios para la interpretación de los marcadores L, pero no se han alcanzado criterios de aceptación común en la interpretación de los marcadores S, lo que sí se ha conseguido para otros patógenos [Vergnaud, 2009]. Esta dificultad se centra específicamente en establecer cuál es el número máximo de diferencias que se pueden aceptar, tanto en el número de alelos como en el número de repeticiones en cada alelo, para agrupar diferentes MLVA tipos en el mismo complejo MLVA.

Los 15 PFGE tipos estudiados se clasificaron como **extensamente resistentes a antimicrobianos (XDR)** ya que sólo presentaban sensibilidad a uno o como máximo dos grupos de antimicrobianos con actividad frente a *A. baumannii* [Magiorakos, 2011]. La resistencia es habitual en los brotes nosocomiales por *A. baumannii*, ya que las cepas resistentes son seleccionadas en el ambiente hospitalario, especialmente en áreas de alto riesgo, como las UCIs [Villegas, 2003; Playford, 2007]. Tres PFGE tipos (EE1, EE10 y EE15) de los cuatro involucrados en los tres brotes descritos en este trabajo fueron además resistentes

a imipenem. También se detectaron PFGE tipos endémicos resistentes a imipenem, como EE9 y EE11, que no habían estado implicados en ningún brote. Ambos mostraron una amplia distribución en diferentes áreas del hospital, y fueron aislados durante largos periodos de tiempo (figuras 1 y 2, artículo 4). EE9 se aisló durante 2005-2008 en las plantas 3<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup> y 5<sup>a</sup>. EE11 se aisló en el periodo 2003-2007 y durante el 2009 en las plantas 3<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup> y 5<sup>a</sup>, UCI, urgencias y consultas externas. La presencia endémica de PFGE tipos XDR supone un riesgo potencial para la aparición de nuevos brotes [Koeleman, 2001].

Los resultados de susceptibilidad y  $\beta$ -lactamasas de este estudio son acordes con los datos epidemiológicos en España, donde la resistencia a carbapenémicos en *A. baumannii* se debe básicamente a la actividad de OXA-40 y OXA-58 [Villalón, 2013]. La idea de la transmisión interhospitalaria de clones XDR de *A. baumannii* viene reforzada por la detección de un patrón común de los genes de ADC, OXA-51 y CHOs adquiridas y sus SIs asociadas, como se ha visto en las parejas de PFGE tipos EE11-Ab54 y EE9-Ab9.

# CONCLUSIONES

---



1. La electroforesis en campo pulsante (PFGE), debido a su elevado poder de discriminación, es una técnica de tipificación molecular imprescindible para realizar un análisis epidemiológico profundo de los aislados epidémicos de *A. baumannii*, tanto en estudios locales restringidos a un único hospital o unidad hospitalaria, como en estudios comparativos a nivel nacional.
2. La tipificación por PFGE de los aislados epidémicos de *A. baumannii* ofrece una información epidemiológica que permite distinguir los aislados esporádicos de los epidémicos, conocer la complejidad clonal de los brotes, conocer la distribución temporal y espacial de los clones epidémicos en los hospitales, demostrar la persistencia a largo plazo de clones endémicos en el ambiente hospitalario, y demostrar la transmisión intra e interhospitalaria de los clones.
3. La utilidad de MLST en la caracterización de los brotes por *A. baumannii* radica en su capacidad para clasificar los aislados en grandes agrupaciones, lo que permite hacer un seguimiento a gran escala de los clones epidémicos nacionales e internacionales.
4. PFGE y MLST son técnicas de tipificación epidemiológica concordantes y complementarias cuando se emplean en estudios de clonalidad de *A. baumannii*.
5. El clon epidémico más representativo en España es el clon internacional II, detectado en más del 50% de los aislados estudiados y representado por el ST-2. Dos secuenciotipos de nueva descripción, el ST-79 y el ST-80, podrían

- representar clones emergentes en proceso de expansión. La presencia de los clones internacionales I y III es minoritaria.
6. La secuenciación parcial del gen *rpoB* se mostró como una herramienta útil en la identificación de la especie *A. baumannii*. Los cinco *rpoB* tipos se correlacionaron con los PFGE tipos obtenidos, aunque el índice de diversidad fue bajo (0,45).
  7. Los aislados epidémicos de *A. baumannii* tienen un perfil de resistencia extensa a antimicrobianos caracterizado por presentar sensibilidad a uno o como máximo dos grupos de antimicrobianos. La resistencia a imipenem afecta aproximadamente al 75% de la población estudiada a nivel nacional. Sin embargo, no se detecta resistencia a colistina.
  8. *ISAba1* es la secuencia de inserción más común, localizada “río arriba” de los genes *bla<sub>ADC</sub>* y *bla<sub>OXA-51-like</sub>*. La carbapenemasa OXA-23 está ausente, a pesar de tener una amplia distribución mundial. La principal causa de resistencia a imipenem es OXA-24, seguida de OXA-58. Los genes de metalo- $\beta$ -lactamasas también están ausentes.
  9. En una UCI de adultos con baja incidencia de *A. baumannii* y con aislamientos sensibles a  $\beta$ -lactámicos, carbapenémicos y aminoglucósidos, tuvo lugar un brote durante 27 semanas con aislamientos con un perfil extenso de resistencia. La caracterización mediante PFGE de cuatro genotipos estrechamente relacionados ( $\geq 90\%$ ) identificó este brote como del tipo monoclonal. El patrón de infección/colonización fue variado: ocho pacientes

presentaron un único episodio, cinco pacientes tuvieron episodios sucesivos por un único PFGE tipo, y cinco pacientes tuvieron episodios sucesivos ocasionados por varios PFGE tipos.

10. El esquema MLVA-8<sub>Orsay</sub> incluye cuatro marcadores L-VNTR que ofrecen una información similar a la de MLST, agrupando los aislados en grandes clones. Además incluye cuatro marcadores S-VNTR que, debido a su gran variabilidad, no permiten establecer criterios interpretativos fijos para el agrupamiento de los aislados en complejos clonales.

MLVA podría ser una método excelente de tipificación para *A. baumannii* si se incorporaran nuevos marcadores S-VNTR al panel y se establecieran criterios acordados para el agrupamiento de los complejos MLVA. Es una técnica que permite hacer un agrupamiento clonal equivalente al de MLST, y ofrece una información tanto o más discriminativa que la de PFGE.



# BIBLIOGRAFÍA

---



## A

**Acosta J, Merino M, Viedma E, Poza M, Sanz F, Otero JR, Chaves F, Bou G.**

2011. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* harboring OXA-24 carbapenemase, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* **17**: 1064-1067.

**Álvarez-Lerma F, Palomar M, Insausti J, Olaechea P, Cerdá E, Castillo F,**

**Martínez-Pellús A.** 2005. Infections caused by *Acinetobacter* spp. in critically ill ICU patients. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **23**: 533-539.

**Ambler RP.** 1980. The structure of  $\beta$ -lactamases. *Phil Trans. R. Soc. London B: Biol.*

*Sci.* **289**: 321-331.

## B

**Barbolla RE, Centron D, Di MA.** 2003. Identification of an epidemic

carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strain at hospitals in Buenos Aires City. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **45**: 261-264.

**Bartual S, Seifert H, Hippler C, Domínguez Luzón 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.

**Beijerinck MW.** 1911. Pigments as products of oxidation by bacterial action.

*KNAW Proceedings.* **13**: 1066-1077.

**Bergogne-Bérézin E, Towner KJ.** 1996. *Acinetobacter* spp. as nosocomial

pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin. Microbiol.*

*Rev.* **9**: 148-165.

**Bou G, Martínez-Beltrán J.** 2000-a. Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC  $\beta$ -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 428-432.

**Bou G, Cerveró G, Domínguez MA, Quereda C, Martínez-Beltrán J.** 2000-b. Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not solely to the presence of beta-lactamases. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 3299-3305.

**Bou G, Oliver A, Martínez-Beltrán J.** 2000-c. OXA-24, a novel class D  $\beta$ -lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 1556-1561.

**Bouvet P, Grimont P.** 1986. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36**: 228-240.

**Bouvet PJM, Jeanjean S.** 1989. Delineation of new proteolytic genomic species in the genus *Acinetobacter*. *Res. Microbiol.* **140**: 291-299.

**Brisou J, Prévot AR.** 1954. Etudes de systematique bacterienne. Revision des especes reunies dans le genre *Achromobacter*. *Ann. Inst. Pasteur.* **86**: 722-728.

**Brown S, Young HK, Amyes SG.** 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.

## C

**Cayô R, Rodríguez MC, Espinal P, Fernández-Cuenca F, Ocampo-Sosa AA, Pascual A, Ayala JA, 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.

**Cefai C, Richards J, Gould FK, McPeake P.** 1990. An outbreak of *Acinetobacter* respiratory tract infection resulting from incomplete disinfection of ventilatory equipment. *J. Hosp. Infect.* **15**: 177-182.

**Chang HC, Wei YF, Dijkshoorn L, Vanechoutte M, Tang CT, Chang TC.** 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.

**Chen Y, Zhou Z, Jiang Y, Yu Y.** 2011. Emergence of NDM-1 producing *Acinetobacter baumannii* in China. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**: 1255-1259.

**Chu YW, Afzal-Shah M, Houang ET, Palepou MI, Lyon DJ, Woodford N, Livermore DM.** 2001. IMP-4, a novel metallo- $\beta$ -lactamase from nosocomial *Acinetobacter* spp. collected in Hong Kong between 1994 and 1998. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**: 710-714.

**Cisneros JM, Rodríguez-Baño J, Fernández-Cuenca F, Ribera A, Vila J, Pascual A, Martínez-Martínez L, Bou G, Pachón J.** 2005. Risk-factors for the acquisition of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Spain: a nationwide study. *Clin. Microbiol. Infect.* **11**: 874-879.

**Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2011. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-first Information Supplement M100-S21*. CLSI, Wayne, PA, USA.

**Coelho JM, Turton JF, Kaufmann ME.** 2006. Occurrence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clones at multiple hospitals in London and Southeast England. *J. Clin. Microbiol.* **44**: 3623-3627.

**Corbella X, Montero A, Pujol M, Domínguez MA, Ayats J, Argerich MJ, Garrigosa F, Ariza J, Gudiol F.** 2000. Emergence and rapid spread of carbapenem resistance during a large and sustained hospital outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 4086-4095.

**Corvec S, Poirel L, Naas T, Drugeon H, Nordmann P.** 2007. Genetics and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene *bla<sub>OXA-23</sub>* in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**: 1530-1533.

## D

**Da Silva G, Dijkshoorn L, van der Reijden T, van Strijen B, Duarte A.** 2006. Identification of widespread, closely related *Acinetobacter baumannii* isolates in Portugal as a subgroup of European clone II. *Clin. Microbiol. Infect.* **13**: 190-195.

- D'Agata E, Thayer V, Schaffner W.** 2000. An outbreak of *Acinetobacter baumannii*: the importance of cross-transmission. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **21**: 588-591.
- Damier-Piolle L, Magnet S, Brémont S, Lambert T, Courvalin P.** 2008. AdeIJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**: 557-562.
- Das I, Lambert P, Hill D, Noy M, Bion J, Elliott T.** 2002. Carbapenem-resistant *Acinetobacter* and role of curtains in an outbreak in intensive care units. *J. Hosp. Infect.* **50**: 110-114.
- Denton M, Wilcox MH, Parnell P, Green D, Keer V, Hawkey PM, Evans I, Murphy P.** 2009. Role of environmental cleaning in controlling an outbreak of *Acinetobacter baumannii* on a neurosurgical intensive care unit. *J. Hosp. Infect.* **56**: 106-110.
- Di Popolo A, Giannouli M, Triasi 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.
- 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.

**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**: 1519-1525.

**Dijkshoorn L, van Aken E, Shunburne L, van der Reijden TJ, Bernards AT, Nemec A, Towner KJ.** 2005. Prevalence of *Acinetobacter baumannii* and other *Acinetobacter* spp. in faecal samples in non-hospitalised individuals. *Clin. Microbiol. Infect.* **11**: 329-332.

**Drancourt M, Bollet C, Carlioz A, Martelin R, Gayral JP, Raoult D.** 2000. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 3623-3630.

## E

**Ecker J, Massire C, Hall T, Ranken R, Pennella TT, Ivy C, Blyn L, Hofstadler S, Endy T, Scott P, Lindler L, Hamilton T, Gaddy C, Snow K, Pe M, Fishbain J, Craft D, Deye G, Riddell S, Milstrey E, Petrucelli B, Brisse S, Harpin V, Schink A, Ecker D, Sampath R, Eshoo M.** 2006. Identification of *Acinetobacter* species and genotyping of *Acinetobacter baumannii* by multilocus PCR and mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **44**: 2921-2932.

**Ellington MJ, Kistler J, Livermore DM, Woodford N.** 2007. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo- $\beta$ -lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* **59**: 321-322.

**Ehrenstein B, Bernardts AT, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Towner KJ, Bouvet P, Daschner F, Grundmann H.** 1996. *Acinetobacter* species identification by using tRNA spacer fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 2414-2420.

**Evans BA, Hamouda A, Towner KJ, Amyes SGB.** 2008. OXA-51-like  $\beta$ -lactamases and their association with particular epidemic lineages of *Acinetobacter baumannii*. *Clin. Microbiol. Infect.* **14**: 268-275.

## **F**

**Falagas ME, Karveli EA.** 2007. The changing global epidemiology of *Acinetobacter baumannii* infections: a development with major public health implications. *Clin. Microbiol. Infect.* **13**: 117-119.

**Fierobe L, Lucet JC, Decré D, Muller-Serieys C, Deleuze A, Jolly-Guillou ML, Mantz J, Desmots JM.** 2001. An outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in critically ill surgical patients. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **22**: 35-40.

**Fournier PE, Richet H.** 2006-a. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clin. Infect. Dis.* **42**: 692-699.

**Fournier PE, 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 JM.** 2006-b. Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Plos Genetics.* **2**: e7.

## G

**García-Garmendia JL, Ortiz-Leyba C, Garnacho-Montero J, Jiménez-Jiménez FJ, Pérez-Paredes C, Barrero-Almodóvar AE, Gili-Miner M.** 2001. Risk factors for *Acinetobacter baumannii* bacteremia in critically ill patients: a cohort study. *Clin. Infect. Dis.* **33**: 939-946.

**Garnacho-Montero J, Ortiz-Leyba C, Fernández-Hinojosa E, Aldabó-Pallás T, Cayuela A, Marquez-Vácaro JA, García-Curiel A, Jiménez-Jiménez FJ.** 2005. *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia: epidemiological and clinical findings. *Intensive Care Med.* **31**: 649-655.

**Garner JS.** 1996. Guideline for isolation precautions in hospitals. The hospital infection control practices advisory committee. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **17**: 53-80.

**Gayoso CM, Mateos J, Méndez JA, Fernández-Puente P, Rumbo C, Tomás M, Martínez de Ilarduya O, Bou G.** 2013. Molecular mechanisms involved in the response to desiccation stress and persistence in *Acinetobacter baumannii*. *J. Proteome Res.* **13**: 460-476.

**Gerner-Smidt P.** 1992. Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 2680-2685.

**Giannouli M, Cucurullo 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.

**Gilad J, Carmeli Y.** 2008. Treatment options for multidrug-resistant *Acinetobacter* species. *Drugs.* **68:** 165-189.

**Gordon NC, Wareham DW.** 2010. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **35:** 219-226.

**Gribun A, Nitzan Y, Pechatnikov I, Hershkovits G, Katcoff DJ.** 2003. Molecular and structural characterization of the HMP-AB gene encoding a pore-forming protein from a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *Curr. Microbiol.* **47:** 434-443.

**Grundmann HJ, Towner KJ, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Maher M, Seifert H, Vaneechoutte M.** 1997. Multicenter study using standardized protocols and reagents for evaluation of reproducibility of PCR-based fingerprinting of *Acinetobacter* spp. *J. Clin. Microbiol.* **35:** 3071-3077.

**Grundmann H, Hori S, Tanner G.** 2001. Determining confidence intervals when measuring genetic diversity and the discriminatory abilities of typing methods for microorganisms. *J. Clin. Microbiol.* **39:** 4190-4192.

## H

**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*<sub>OXA-51-like</sub> genes. *J. Clin. Microbiol.* **48**: 2476-2483.

**Hauck Y, Soler C, Jault P, Mérens A, Gérôme P, Mac Nab C, Trueba F, Barges L, Thien HV, Vergnaud G, Pourcel C.** 2012. Diversity of *Acinetobacter baumannii* in four French military hospitals, as assessed by multiple locus variable number of tandem repeat analysis. *PLoS One.* **7**: e44597.

**Héritier C, Poirel L, Lambert T, Nordmann P.** 2005. Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 3198-3202.

**Héritier C, Poirel L, Nordmann P.** 2006. Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of IS*Aba1* in *Acinetobacter baumannii*. *Clin. Microbiol. Infect.* **12**: 123-130.

**Higgins PG, 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.

**Higgins PG, Poirel L, Lehmann M, Nordmann P, Seifer H.** 2009. OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D  $\beta$ -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**: 5035-5038.

**Higgins PG, Lehmann M, Wisplinghoff H, Seifert H.** 2010-a. *gyrB* multiplex PCR to differentiate between *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter* genomic species 3. *J. Clin. Microbiol.* **48**: 4592-4594.

**Higgins PG, Dammhayn C, Hackel M, Seifert H.** 2010-b. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**: 233-238.

**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.* **69**: 2383-2387.

**Hu Y, Li B, Jin D, Cui Z, Tao X, Zhang B, Zhang J.** 2013. Comparison of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis with pulsed-field electrophoresis typing of *Acinetobacter baumannii* in China. *J. Clin. Microbiol.* **51**: 1263-1268.

**Hujer KM, Hamza NS, Hujer AM, Pérez F, Helfand MS, Bethel CR, Thomson JM, Anderson VE, Barlow M, Rice LB, Tenover FC, Bonomo RA.** 2005. Identification of a new allelic variant of the *Acinetobacter baumannii* cephalosporinase, ADC-7  $\beta$ -lactamase: defining a unique family of class C enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 2941-2948.

**Hunter PR, Gaston MA.** 1998. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* **26**: 2465-2466.

Huys G, Cnockaert M, Vaneechoutte M, Woodford N, Nemec A, Dijkshoorn L, Swings J. 2005. Distribution of tetracycline resistance genes in genotypically related and unrelated multiresistant *Acinetobacter baumannii* strains from different European hospitals. *Res. Microbiol.* **156**: 348-355.

## I

Iacono M, Villa L, Fortini D, Bordoni R, Imperi F, Bonnal RJ, Sicheritz-Ponten T, De Bellis G, Visca P, Cassone A, Caratolli A. 2008. Whole-genome pyrosequencing of an epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain belonging to the European clone II group. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**: 2616-2625.

IS Finder. Laboratoire de Microbiologie et Génétic Moléculaires. <http://www-is.biotoul.fr> (4 June 2012, date last accessed).

## J

Janssen P, Coopman R, Huys G, Swings J, Bleeker M, Vos P, Zabeau M, Kersters K. 1996. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in taxonomy. *Microbiology.* **142**: 1881-1893.

## K

Karthikeyan K, Thirunarayan MA, Krishnan P. Coexistence of *bla*<sub>OXA-23</sub> with *bla*<sub>NDM-1</sub> and *armA* in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from India. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**: 2253-2254.

**Katragkou A, Kotsiu M, Antachopoulos C, Benos A, Sofianou D, Tamiolaki M, Roilides E.** 2006. Acquisition of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a pediatric intensive care unit: a case-control study. *Intensive Care Med.* **32**: 1384-1391.

**Ko KS, Suh JY, Kwon KT, Jung SI, Park KH, Kang CI, Chung DR, Peck KR, Song JH.** 2007. High rates of resistance to colistin and polymixin B in subgroups of *Acinetobacter baumannii* isolates from Korea. *J. Antimicrob. Chemother.* **60**: 1163-1167.

**Koeleman JGM, van der Bijl MW, Stoof J, Vandenbroucke-Grauls CMJ, Salvelkoul PHM.** 2001. Antibiotic resistance is a major risk factor for epidemic behavior of *Acinetobacter baumannii*. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **22**: 284-288.

## L

**La Scola B, Gundi V, 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.

**Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD, Rossolini GM, Chong Y.** 2005. Novel acquired metallo- $\beta$ -lactamase gene, *bla<sub>SIM-1</sub>*, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 4485-4491.

**Lee JK, Lee YS, Park YK, Kim BS.** 2005. Mutations in the *gyrA* and *parC* genes in ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* in Korea. *Microbiol. Immunol.* **49**: 647-653.

**Limansky AS, Mussi MA, Viale AM.** 2002. Loss of a 29-kilodalton outer membrane protein in *Acinetobacter baumannii* is associated with imipenem resistance. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 4776-4778.

**Liu Q, Li W, Feng Y, Tao C.** 2014. Efficacy and safety of polymyxins for the treatment of *Acinetobacter baumannii* infection: a systematic review and meta-analysis. *Plos One.* **9 (6)**: e98091.

## M

**Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monet DL.** 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* **18**: 268-281.

**Magnet S, Courvalin P, Lambert T.** 2001. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**: 3375-3380.

**Maiden M.** 2006. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **60**: 561-588.

**Mak JK, Kim MJ, Pham J, Tapsall J, White PA.** 2009. Antibiotic resistance determinants in nosocomial strains of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* **63**: 47-54.

**Manikal VM, Landman D, Saurina G, Oydna E, Lal H, Quale J.** 2000. Endemic carbapenem-resistant *Acinetobacter* species in Brooklyn, New York: citywide prevalence, interinstitutional spread, and relation to antibiotic usage. *Clin. Infect. Dis.* **31**: 101-106.

**del Mar Tomas M, Cartelle M, Pertega S, Beceiro A, Llinares P, Canle D, Molina F, Villanueva R, Cisneros JM, Bou G.** 2005. Hospital outbreak caused by a carbapenem-resistant strain of *Acinetobacter baumannii*: patient prognosis and risk-factors for colonisation and infection. *Clin. Microbiol. Infect.* **11**: 540-546.

**Maragakis L, Perl T.** 2008. *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. *Clin. Infect. Dis.* **46**: 1254-1263.

**Marchaim D, Navon-Venezia S, Leavitt A, Chmelnisky I, Schwaber MJ, Carmeli Y.** 2007. Molecular and epidemiology study of polyclonal outbreaks of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection in an Israeli hospital. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **28**: 945-950.

**Marcos MA, Abdalla S, Pedraza F, Andreu A, Fernández F, Gómez-Lus R, Jiménez de Anta MT, Vila J.** 1994. Epidemiological markers of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from a spinal cord injury unit. *J. Hosp. Infect.* **28**: 39-48.

**Martins N, Dalla-Costa L, Uehara AA, Riley LW, Moreira BM.** 2013. Emergence of *Acinetobacter baumannii* international clone II in Brazil: reflection of a global expansion. *Infect. Genet. Evol.* **20**: 378-380.

McDonald LC, Banerjee SN, Jarvis WR and National Nosocomial Infections Surveillance System. 1999. Seasonal variation of *Acinetobacter* infections: 1987-1996. *Clin. Infect. Dis.* **29**: 1133-1137.

Merkier AK, Centrón D. 2006. *bla*<sub>OXA-51-type</sub>  $\beta$ -lactamase genes are ubiquitous and vary within a strain in *Acinetobacter baumannii*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **28**: 110-113.

Merkier AK, Catalano M, Ramírez MS, Quiroga C, Orman B, Ratier L, Famiglietti A, Vay C, Di Martino A, Kaufman S, Centrón D. 2008. Polyclonal spread of *bla*<sub>OXA-23</sub> and *bla*<sub>OXA-58</sub> in *Acinetobacter baumannii* isolates from Argentina. *J. Infect. Dev. Ctries.* **2**: 235-240.

Monterrubio-Villar J, González-Velasco C, Valdezate-Ramos S, Córdoba-López A, Villalón-Panzano P, Saéz-Nieto JA. 2009. Outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* in a polyvalent intensive care unit: clinical, epidemiological analysis and PFGE-printing evolution. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **28**: 1281-1284.

Mosqueda N, Espinal P, Cosgaya C, Viota S, Plasencia V, Álvarez-Lerma F, Montero M, Gómez J, Horcajada JP, Vila J, Roca I. 2013. Globally expanding carbapenemase finally appears in Spain: nosocomial outbreak of *Acinetobacter baumannii* producing plasmid-encoded OXA-23 in Barcelona. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**: 5155-5157.

**Moubarek C, Brémont S, Conroy MC, Courvalin P, Lambert T.** 2009. GES-11, a novel integron-associated GES variant in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**: 3579-3581.

## N

**Nagano N, Nagano Y, Cordevant C, Shibata N, Arakawa Y.** 2004. Nosocomial transmission of CTX-M-2  $\beta$ -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* in a neosurgery ward. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 3978-3984.

**Naiemi NA, Duim B, Savelkoul PH, Spanjaard L, de Jonge E, Bart A, Vandenbroucke-Grauls CM, de Jong MD.** 2005. Widespread transfer of resistance genes between bacterial species in an intensive care unit: implications for hospital epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 4862-4864.

**Nei M, Li WH.** 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**: 5269-5273.

**Nemec A, Dijkshoorn L, van der Reijden TJ.** 2004-a. Long-term predominance of two pan-European clones among multi-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in the Czech Republic. *J. Med. Microbiol.* **53**: 147-153.

**Nemec A, Dolzani L, Brisse S, van den Broek P, Dijkshoorn L.** 2004-b. 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.

Nemec A, Krizova L, Maixnerova M, van der Reijden T, Deschaght P, Passet V, Vanechoutte 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.

## O

Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. 2014. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Frontiers Microbiol.* **5**: 643

## P

Pailhoriès H, Daure S, Eveillard M, Joly-Guillou ML, Kempf M. 2015. Using Vitek MALDI-TOF mass spectrometry to identify species belonging to the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex: a relevant alternative to molecular biology? *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* **83**: 99-104.

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

Playford EG, Craig JC, Iredell JR. 2007. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in intensive care unit patients: risk factors for acquisition, infection and their consequences. *J. Hosp. Infect.* **65**: 204-211.

Poirel L, Menuteau O, Agoli N, Cattoen C, Nordmann P. 2003. Outbreak of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase VEB-1 producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 3542-3547.

- Poirel L, Marqué S, Héritier C, Segonds C, Chabanon G, Nordmann P.** 2005. OXA-58, a novel class D  $\beta$ -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 202-208.
- Poirel L, Nordmann P.** 2006-a. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.* **12**: 826-836.
- Poirel L, Nordmann P.** 2006-b. Genetic structures at the origin of acquisition and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene *bla*<sub>OXA-58</sub> in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**: 1442-1448.
- Pourcel C, Minandri F, Hauck Y, D'Arezzo S, Imperi F, Vergnaud G, Visca P.** 2011. Identification of variable-number tandem-repeat (VNTR) sequences in *Acinetobacter baumannii* and interlaboratory validation of an optimized multiple-locus VNTR analysis typing scheme. *J. Clin. Microbiol.* **49**: 539-548.
- Pournaras S, Ikonomidis A, Markogiannakis A, Maniatis AN, Tsakris A.** 2005. Heteroresistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* doi:10.1093/jac/dki115.
- Pournaras S, Gogou V, Giannouli M, Dimitroulia E, Dafopoulou K, Tsakris A, Zarrilli R.** 2014. Single-locus-sequence-based typing of *bla*<sub>OXA-51-like</sub> genes for rapid assignment of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates to international clonal lineages. *J. Clin. Microbiol.* **52**: 1653-1657.

## R

- Rafei R, Hamze M, Pailhoriès H, Eveillard M, Marsollier L, Joly-Guillou ML, Dabboussi F, Kempf M.** 2015. Extrahuman epidemiology of *Acinetobacter baumannii* in Lebanon. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**: 2359-2367.
- Ribera A, Ruiz J, Vila J.** 2003. Presence of the TetM determinant in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**: 2310-2312.
- Riley TV, Webb SA, Cadwallader H, Briggs BD, Christiansen L, Bowman RA.** 1996. Outbreak of gentamicin-resistant *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit: clinical, epidemiological and microbiological features. *Pathology.* **28**: 359-363.
- Roberts SA, Findlay R, Lang DR.** 2001. Investigation of an outbreak of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* in an intensive care burns unit. *J. Hosp. Infect.* **48**: 228-232.
- Roca I, Martí S, Espinal P, Martínez P, Gibert I, Vila J.** 2009. CraA, a major facilitator superfamily efflux pump associated with chloramphenicol resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**: 4013-4014.
- Robledo IE, Aquino EE, Santé MI, Santana JL, Otero DM, León CF, Vázquez GJ.** 2010. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**: 1354-1357.

Rodríguez-Baño J, Cisneros JM, Fernández-Cuenca F, Ribera A, Vila J, Pascual A, Martínez-Martínez L, Bou G, Pachón J. 2004. Clinical features and epidemiology of *Acinetobacter baumannii* colonization and infection in Spanish hospitals. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **25**: 819-824.

## S

Segal H, Elisha BG. 2005-a. Use of Etest MBL strips for the detection of carbapenemases in *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**: 598.

Segal H, Garny S, Elisha BG. 2005-b. Is IS*Aba1* customized for *Acinetobacter*? *FEMS Microbiol. Lett.* **243**: 425-429.

Seifert H, Gerner-Smidt P. 1995. Comparison of ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Acinetobacter* isolates. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 1402-1407.

Seifert H, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Pelzer N, Tjernerberg I, Vaneechoutte M. 1997. Distribution of *Acinetobacter* species in 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.

Souli M, Galani I, Giamarellou H. 2008. Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. *Euro Surveill.* **13** (47): article 5.

**Srinivasan VB, Rajamohan G, Gebreyes WA.** 2009. The role of a novel efflux pump AbeS, member of the SMR family of transporters in resistance to antimicrobial agents in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**: 5312-5316.

**Su XZ, Chen J, Mizushima T, Kuroda T, Tsuchiya T.** 2005. AbeM, an H<sup>+</sup>-coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 4362-4364.

## **T**

**Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing BH, Swaminathan B.** 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 2233-2239.

**Tjernberg I, Ursing J.** Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* **97**: 595-605.

**Touchon M, Cury J, Yoon EJ, Krizova L, Cerqueira G, Murphy C, Feldgarden M, Wortman J, Clermont D, Lambert T, Grillo-Courvalin C, Nemeč A, Courvalin P, Rocha E.** 2014. The genomic diversification of the whole *Acinetobacter* genus: origins, mechanisms, and consequences. *Genome Biol. Evol.* **6**: 2866-2882.

**Towner KJ.** 2009. *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. *J. Hosp. Infect.* **73**: 355-363.

**Turton JF, Kaufmann ME, Warner M, Coelho J, Dijkshoorn L, van der Reijden T, Pitt TL.** 2004. A prevalent, multiresistant clone of *Acinetobacter baumannii* in Southeast England. *J. Hosp. Infect.* **58**: 170-179.

**Turton JF, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Pike R, Livermore DM, Pitt TL.** 2006. The role of IS*Aba1* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol. Lett.* **258**: 72-77.

**Turton JF, Gabriel SN, 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.

## V

**Vahaglobu H, Coskuncan F, Tansel O, Ozturk R, Sahin N, Koksal I, Kocaceybek B, Tatman-Otkun M, Leblebicioglu H, Ozinel MA, Akalin H, Kocagoz S, Korten V.** 2001. Clinical importance of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (PER-1-type) producing *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* strains. *J. Med. Microbiol.* **50**: 642-645.

**van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, Fussing V, Green J, Feil E, Gerner-Smidt P, Brisse S, Struelens M.** 2007. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **13**: 1-46.

van der Broek PJ, Arends J, Bernardts T, De Brauwier E, Mascini EM, van der Reijden T, Spanjaard L, Thewessen E, van der Zee A, van Zeijl JH, Dijkshoorn L. 2006. Epidemiology of multiple *Acinetobacter* outbreaks in the Netherlands during the period 1999-2001. *Clin. Microbiol. Infect.* **12**: 837-843.

van Dessel H, Dijkshoorn L, van der Reijden T, Bakker N, Paauw A, van der Broek PJ, Verhoef J, Brisse S. 2004. Identification of a new geographically widespread multiresistant *Acinetobacter baumannii* clone from European hospitals. *Res. Microbiol.* **155**: 105-112.

Vergnaud G, Pourcel C. 2009. Multiple locus variable number of tandem repeats analysis. *Methods Mol. Biol.* **551**: 141-158.

Villalón P, Valdezate S, Medina-Pascual MJ, Rubio V, Vindel A, Saez-Nieto JA. 2011. Clonal diversity of nosocomial epidemic *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Spain. *J. Clin. Microbiol.* **49**: 875-882.

Villalón P, Valdezate S, Medina-Pascual MJ, Carrasco G, Vindel A, Saez-Nieto JA. 2013. Epidemiology of the *Acinetobacter*-derived cephalosporinase, carbapenem-hydrolysing oxacillinase and metallo- $\beta$ -lactamase genes, and of common insertion sequences, in epidemic clones of *Acinetobacter baumannii* from Spain. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**: 550-553.

Villalón P, Valdezate S, Cabezas T, Ortega M, Garrido N, Vindel A, Medina-Pascual MJ, Saez-Nieto JA. 2015. Endemic and epidemic *Acinetobacter baumannii* clones: a twelve-year study in a tertiary care hospital. *BMC Microbiol.* **15**: 47.

**Villegas MV, Harstein AI.** 2003. *Acinetobacter* outbreaks, 1977-2000. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **24**: 284-295.

## W

**Wang SH, Sheng WH, Chang YY, Wang LH, Lin HC, Chen ML, Pan HJ, Ko WJ, Chang SC, Lin FY.** 2003. Healthcare-associated outbreak due to pan-drug resistant *Acinetobacter baumannii* in a surgical intensive care unit. *J. Hosp. Infect.* **53**: 97-102.

**Weernink A, Severin WP, Tjernberg I, Dijkshoorn L.** 1995. Pillows, an unexpected source of *Acinetobacter*. *J. Hosp. Infect.* **29**: 189-199.

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

**Wisplinhoff H, Schmitt R, Wöhrmann A, Stefanik D, Seifert H.** 2007. Resistance to disinfectants in epidemiologically defined clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J. Hosp. Infect.* **66**: 174-181.

**Woodford N, Ellington MJ, Coehlo JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, Amyes S, Livermore DM.** Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. 2006. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **27**: 351-353.

## Y

**Yamamoto S, Bouvet PJM, 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.

**Yamane K, Wachino J, Doi Y, Kurokawa H, Arakawa Y.** 2005. Global spread of multiple aminoglycoside resistance genes. *Emerg. Infect. Dis.* **11**: 951-953.

**Yum JH, Yi K, Lee H, Yong D, Lee K, Kim JM, Rossolini GM, Chong Y.** 2002. Molecular characterization of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomospecies 3 from Korea: identification of two new integrons carrying the *bla*<sub>VIM-2</sub> cassettes. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**: 837-840.



