

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Trieste

Dottorato di Ricerca in Farmacologia, Chemioterapia e Microbiologia
XV Ciclo

RUOLO DEGLI INTEGRONI NELLA TRASMISSIONE DI ANTIBIOTICO-RESISTENZE IN *ACINETOBACTER*

Coordinatore:

Ch.mo prof. Tullio Giraldi

Università degli Studi di Trieste



Tutore:

Dr.ssa Lucilla Dolzani

Università degli Studi di Trieste



Dottoranda:

Francesca Gombac 176



INDICE

1. INTRODUZIONE.....	3
1.1 IL GENERE <i>Acinetobacter</i>	3
1.2 TASSONOMIA	3
1.3 METODI DI IDENTIFICAZIONE.....	4
1.4 DIFFUSIONE DEL GENERE	6
1.5 INTEGRONI.....	6
1.6 POMPE DI EFFLUSSO	10
1.7 SCOPO DELLA RICERCA.....	11
2. MATERIALI E METODI.....	12
2.1 CEPPI BATTERICI E COLTURA	12
2.2 IDENTIFICAZIONE DEL GENERE	13
2.3 ESTRAZIONE DI DNA GENOMICO	15
2.4 IDENTIFICAZIONE DI SPECIE.....	16
2.5 TEST FENOTIPICI	17
2.5.1 Identificazione fenotipica	18
2.6 CLONAZIONE E SEQUENZIAMENTO DEL GENE CODIFICANTE L'rRNA16S DEL CEPO 28C.....	19
2.7 VALUTAZIONE DELL'ANTIBIOTICO-RESISTENZA.....	20
2.8 SCREENING PER LA PRESENZA DEL GENE <i>int1</i>	21
2.9 AMPLIFICAZIONE DELLA REGIONE VARIABILE DELL'INTEGRONE DI TIPO 1	22
2.10 ANALISI DI RESTRIZIONE DELLA REGIONE VARIABILE DEGLI INTEGRONI DI TIPO 1	23
2.11 SEQUENZIAMENTO DELLA REGIONE VARIABILE DEGLI INTEGRONI DI TIPO 1	23
2.12 RICERCA DEL GENE <i>int2</i> *	23
2.13 RIBOTIPIZZAZIONE	24
2.14 LOCALIZZAZIONE DEGLI INTEGRONI DI TIPO 1	25
2.15 RICERCA DEL GENE <i>adeB</i>	26
3. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	27
3.1 RACCOLTA DI CEPPI AMBIENTALI	27
3.2 IDENTIFICAZIONE DEL GENERE	28

3.3 IDENTIFICAZIONE DELLE GENOMOSPECIE.....	30
3.4 CARATTERIZZAZIONE FENOTIPICA DEI CEPPI AMBIENTALI.....	37
3.5 SEQUENZIAMEMTO DEL GENE CODIFICANTE L' rRNA 16S DEL CEPP0 28C.....	39
3.6 ANTIBIOTICO-RESISTENZA	40
3.7 RICERCA GENE DELL' INTEGRASI DI TIPO 1	42
3.8 AMPLIFICAZIONE DELLA REGIONE VARIABILE DEGLI INTEGRONI DI TIPO 1	44
3.9 ANALISI DELL'INTEGRONE DI TIPO 1.....	46
3.10 SEQUENZA DELLA REGIONE VARIABILE DEGLI INTEGRONI DI TIPO 1.....	47
3.11 RIBOTIPIZZAZIONE.....	49
3.12 PRESENZA DI INTEGRONI IDENTICI IN CEPPI GENOTIPICAMENTE DISTINGUIBILI.....	52
3.13 DETERMINAZIONE DELLA LOCALIZZAZIONE DEGLI INTEGRONI DI TIPO 1 E DEL LORO NUMERO DI COPIE	55
3.14 CORRELAZIONE TRA ANTIBIOTICO RESISTENZA E PRESENZA DI INTEGRONI DI TIPO 1	56
3.15 RICERCA DEL GENE <i>intI2</i> *.....	59
3.16 RICERCA DI POMPE DI EFFLUSSO.....	60
4. CONCLUSIONI.....	62
5. BIBLIOGRAFIA.....	66

1. INTRODUZIONE

1.1 Il genere *Acinetobacter*

I batteri appartenenti al genere *Acinetobacter* sono coccobacilli Gram negativi, catalasi positivi ed ossidasi negativi, immobili, strettamente aerobi. Possono utilizzare una grande varietà di substrati come fonti di carbonio (raramente, però, il glucosio) e possono essere coltivati su terreni relativamente semplici come il trypticase soya agar o il nutrient agar. Gli *Acinetobacter* sono molto diffusi in natura. Si trovano facilmente nel suolo, nell'acqua (dove rappresentano lo 0,001% della popolazione eterotrofica) (Baumann, 1968) e in una grande varietà di generi alimentari, inclusi prodotti caseari, prodotti derivati dal pollame e cibi congelati. Costituiscono, inoltre, parte dei microrganismi dei fanghi attivi e della flora batterica umana (tratto respiratorio, genitourinario e cute) e vengono comunemente isolati dall'ambiente ospedaliero.

Per molti anni questi batteri sono stati considerati come saprofiti, le cui occasionali infezioni ospedaliere, in pazienti debilitati, venivano accettate dalla letteratura medica con una certa curiosità, ma con poca attenzione. La loro importanza clinica è emersa a partire dal 1970 circa. Da allora, gli *Acinetobacter* sono stati chiamati sempre più frequentemente in causa come responsabili di infezioni ospedaliere, rivelandosi importanti patogeni nosocomiali in grado di sviluppare rapidamente resistenze nei confronti degli antibiotici comunemente usati con conseguenti gravi problemi terapeutici (Bergogne-Bérézin, 1996).

1.2 Tassonomia

Prima che una particolare specie batterica possa essere indicata come causa di infezioni e riconosciuta come potenzialmente patogena per l'uomo, deve essere chiaramente definita, classificata e identificata. Uno dei motivi per cui l'*Acinetobacter* era poco conosciuto è in effetti attribuibile anche alla sua confusa e difficile tassonomia. Sebbene il concetto dell'esistenza del genere *Acinetobacter* fosse stato proposto per la prima volta nel 1954 (Brisou e Prévot, 1954), da allora

seguirono anni di cambiamenti tassonomici che portarono, appena nel 1986, allo stabilimento dell'attuale sistema di classificazione (Bouvet e Grimont, 1986).

Da allora, utilizzando la tecnica dell'ibridazione DNA-DNA, sono stati descritti 23 gruppi di DNA o genomospecie (Bouvet e Grimont, 1986; Tjernberg e Ursing, 1989; Bouvet e Jeanjean, 1989; Nemeč et al., 2001; Vaneechoutte et al., 1999). A 10 di questi è stato attribuito un nome e precisamente: *Acinetobacter calcoaceticus* (genomospecie 1), *A. baumannii* (genomospecie 2), *A. haemoliticus* (genomospecie 4), *A. junii* (genomospecie 5); *A. johnsonii* (genomospecie 7); *A. lwoffii* (genomospecie 8); *A. radioresistens* (genomospecie 12); *A. ursingii* (phenom 1); *A. schindlerii* (phenom 2) ed infine *A. venetianus*.

I rimanenti gruppi sono stati designati da un numero. A causa di studi paralleli condotti in laboratori differenti sono emerse tuttavia delle divergenze sulla loro numerazione. Nel 1989 Tjernberg e Ursing presentarono 3 gruppi numerandoli dal 13 al 15 e contemporaneamente Bouvet e Jeanjean i gruppi dal 13 al 18. Confrontando i due studi, il gruppo 13 di Bouvet e Jeanjean (BJ) è risultato corrispondente al gruppo 14 di Tjernberg e Ursing (TU) mentre per gli altri gruppi non è emersa alcuna apparente correlazione (Dijkshoorn e van der Toorn, 1992).

I gruppi numero 1 (*A. calcoaceticus*), numero 2 (*A. baumannii*) numero 3 e numero 13TU risultano, inoltre, essere genotipicamente molto vicini e difficilmente distinguibili con test fenotipici. Per tale motivo molto spesso si parla di un unico complesso denominato *A. calcoaceticus-A. baumannii* (Gerner-Smidt et al., 1991).

La tassonomia del genere è comunque in continua evoluzione. Esistono, infatti, numerose sequenze del gene rDNA 16S depositate in GenBank di ceppi di *Acinetobacter* che devono essere ancora caratterizzati.

1.3 Metodi di identificazione

Il metodo di riferimento per stabilire l'appartenenza al genere *Acinetobacter* di un isolato è costituito dal test di trasformazione di Juni (Juni, 1972). Sono inoltre state descritte due sonde genere specifiche complementari a sequenze altamente conservate (Wagner et al., 1994; Lagatolla et al., 1998).

Per l'identificazione di specie la tecnica di riferimento è l'ibridazione DNA-DNA. Essa però non è applicabile nella maggior parte dei laboratori. Per tale motivo

sono stati descritti metodi di identificazione sia fenotipici che genotipici più semplici.

L'identificazione da un punto di vista fenotipico non è sempre possibile, soprattutto per quei gruppi di DNA che sono molto simili, come è il caso del complesso *A. calcoaceticus-A. baumannii*, mentre in altri casi lo schema di test enzimatici, nutrizionali e di crescita proposto da Bouvet e Grimont (1986) può non coprire la variabilità fenotipica di tutte le specie genomiche.

Accanto ai test fenotipici si sono sviluppate, quindi, diverse metodiche di biologia molecolare. Alcune di queste tecniche si basano sull'analisi di restrizione di geni o sequenze altamente conservate, come la *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis* (ARDRA) (Vaneechoutte et al., 1995; Dijkshoorn et al., 1998), il PCR-ribotyping (Dolzani et al., 1995) applicabile alle specie del complesso *A. calcoaceticus-A. baumannii*, il tRNA spacer fingerprinting (Ehrenstein et al., 1996) o l'analisi di restrizione del gene *recA* (Nowak e Kur, 1995); altre invece identificano i ceppi di alcune genomospecie analizzando i pattern ottenuti con metodi di tipizzazione quali il ribotyping (Gerner-Smidt, 1992) e l'AFLP (Janseen e Dijkshoorn, 1996); mentre altre ancora utilizzano sonde specie-specifiche (Lagatolla et al., 1998).

Nonostante i progressi fatti nel chiarire la tassonomia del genere *Acinetobacter* e gli sforzi maturati per sviluppare facili metodi di identificazione, essa a livello di specie risulta ancora problematica soprattutto per quegli isolati caratterizzati da tratti fenotipici e genotipici diversi da quelli delle genomospecie più diffuse (Guardabassi et al., 1999; Carr et al., 2001). In modo particolare queste difficoltà sono state incontrate nello studio della popolazione di *Acinetobacter* di fanghi attivi, dove la variabilità incontrata è risultata molto elevata (Barberio e Fani, 1998; Carr et al., 2001). Combinazioni di più metodi sono quindi consigliate.

Per distinguere ceppi diversi appartenenti alla stessa specie si deve ricorrere alla tipizzazione (Dijkshoorn, 1996).

I metodi di tipizzazione sono molteplici. Essi includono sia quelli fenotipici (biotipo, antibiogramma, serotipo, tipizzazione fagica), purtroppo soggetti a variabili, quali ad esempio il livello di espressione dei singoli caratteri (Bergogne-Bérézin e Towner, 1996), che quelli genotipici. (profilo plasmidico, PCR-fingerprinting, ribotipizzazione, macrorestrizione e AFLP). Tra questi metodi, la

macrorestrizione (Seifert e Gerner-Smidt, 1995) e l'AFLP (Janseen e Dijkshoorn, 1996) sono ritenuti i più discriminanti, anche se molto laboriosi.

1.4 Diffusione del genere

Sebbene il genere sia diffuso un po' ovunque, e gli habitat naturali della maggior parte delle specie di *Acinetobacter* non siano stati ancora ben determinati, è stata riscontrata una significativa differenza nella distribuzione delle specie di *Acinetobacter* ritrovabili in ambienti diversi, come acque, suolo, cibi, arredi o apparecchiature ospedaliere. Ad esempio, *A. calcoaceticus* è considerata una specie prevalentemente ambientale, insieme a *A. johnsonii* e a *A. lwoffii*, che però sono occasionalmente isolate anche dall'uomo. Viceversa, le genomospecie 2, 3 e 13 sono state isolate principalmente in ambiente nosocomiale e da campioni clinici (Towner, 1996). Il più importante patogeno del genere è l'*A. baumannii*, noto per la sua capacità di colonizzare ed infettare pazienti ospedalizzati gravemente debilitati. Ceppi di tale specie sono in grado di persistere nell'ambiente nosocomiale e dare origine ad epidemie. Generalmente i pazienti infettati sono immunodepressi (ustionati o con tumori), per lungo tempo ricoverati, sottoposti ad una prolungata terapia antibiotica e/o a procedure invasive. I principali siti di infezione sono i tratti respiratorio ed urinario, il sangue e la cute (Levi e Rubinstein, 1996). Gli isolati clinici, particolarmente quelli epidemici, sono frequentemente resistenti ad un grande numero di antibiotici, così che il trattamento terapeutico è ridotto alla scelta di uno o pochi chemioterapici. Per tutti questi motivi, le infezioni, specialmente quelle che coinvolgono pazienti ricoverati nelle unità di terapia intensiva (ICU), sono spesso associate ad un alto livello di mortalità (Bergogne-Bérézin e Towner, 1996). Ad esempio, la mortalità delle polmoniti nosocomiali da *Acinetobacter baumannii*, quando contratte in ICU, è dell'ordine del 70-75%, molto più elevata di quella associata ad altri batteri, sia Gram positivi che Gram negativi, con l'eccezione di *Pseudomonas aeruginosa* (Chastre et al., 1996).

1.5 Integroni

Confrontati con gli altri Gram negativi, sono poco noti i meccanismi tramite i quali gli *Acinetobacter* acquisiscono i geni per l'antibiotico-resistenza.

Recentemente, un ruolo principale nella diffusione e nell'evoluzione delle resistenze è stato attribuito agli integroni.

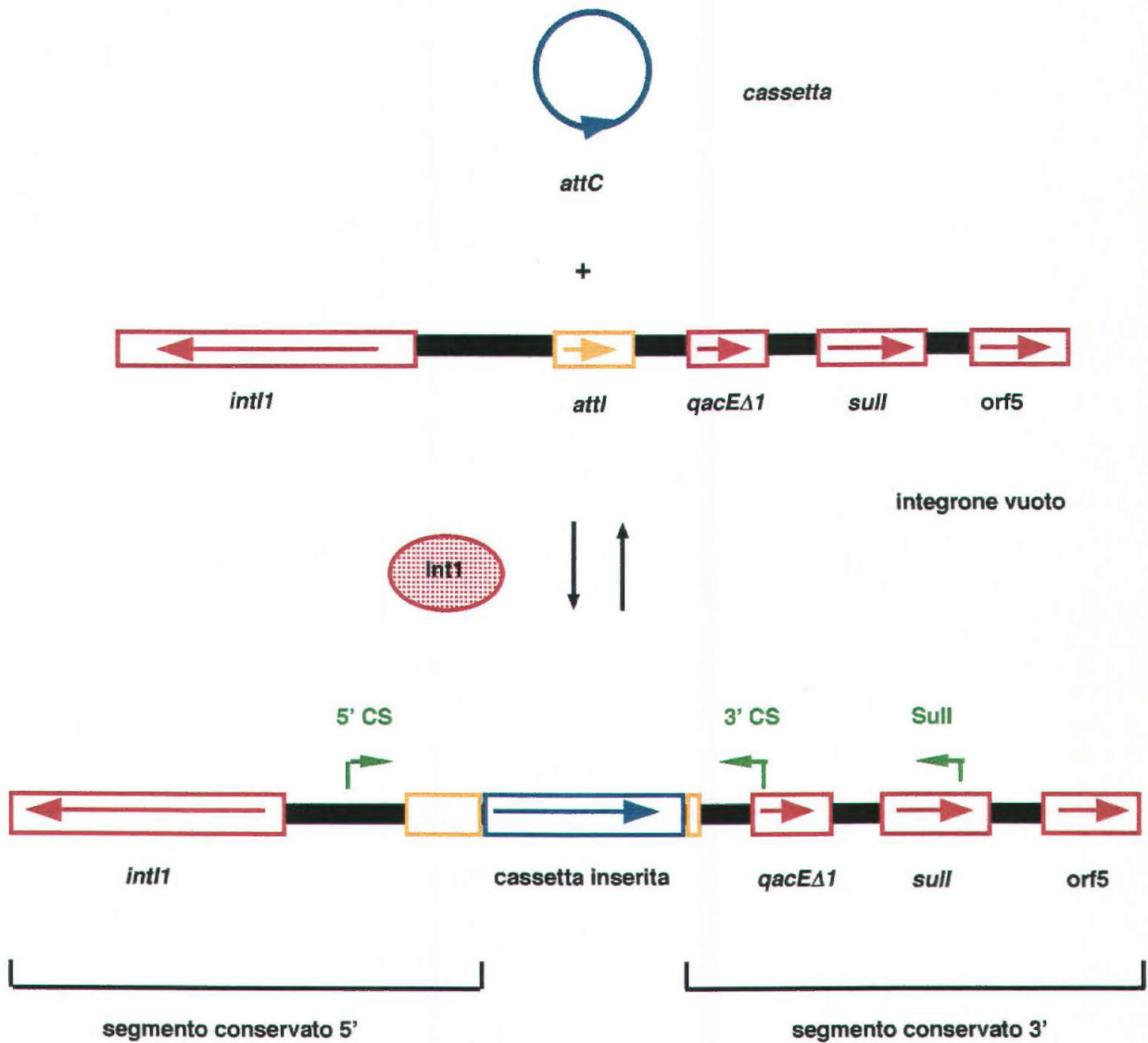
Gli integroni sono elementi genetici costituiti da un gene codificante un'integrasi (*intI*), fiancheggiato da un sito di ricombinazione, *attI*, dove possono venire inserite o excise, con un meccanismo di ricombinazione sito-specifica catalizzato dall'integrasi stessa, una o più cassette geniche. Tali cassette sono presenti nell'ambiente come molecole circolari, contenenti un singolo gene e un sito specifico di ricombinazione noto come *elemento di 59 basi* (Figura 1). Finora, ne sono note più di 60 tipi diversi, per la maggior parte contenenti determinanti per l'antibiotico resistenza (Recchia e Hall, 1995), ma anche geni codificanti enzimi coinvolti in attività metaboliche (Stokes et al., 2001), e ORF (Open Reading Frame) il cui prodotto avrebbe funzione sconosciuta. Una volta inserite nel sito *attI*, le cassette costituiscono la regione variabile dell'integrone, e il loro numero, l'ordine e la sequenza possono variare da un elemento all'altro. Sono stati anche descritti integroni vuoti e con cassette delete o fuse (Recchia e Hall, 1995).

Gli integroni non sono di per sé elementi mobili, però sono spesso associati a trasposoni e/o a plasmidi che possono promuoverne il trasferimento. In base all'omologia della sequenza del gene dell'integrasi sono state descritte almeno 9 tipologie di integroni.

Gli integroni di tipo 1, contengono il gene dell'integrasi *IntI1*, sono i più diffusi tra i batteri Gram negativi (Carattoli, 2001) ed anche i meglio caratterizzati da un punto di vista strutturale (Figura 1). Essi possiedono due regioni conservate, fiancheggianti da entrambi i lati il sito di ricombinazione *attI* (Lévesque et al., 1995). La regione conservata al 5' comprende il gene dell'integrasi (*intI1*) ed due promotori da cui dipende la trascrizione delle cassette inserite. La regione conservata al 3', le cui dimensioni possono essere variabili (Hall et al., 1994), contiene il gene per la resistenza alle sulfonamidi, *sulI*, un allele difettivo (*qacEdelta1*) del gene *qacE*, che conferisce resistenza sia a composti di ammonio quaternari che all'etidio bromuro, ed una ORF (ORF5), di funzione sconosciuta.

Gli integroni di tipo 2 sono caratterizzati da un gene difettivo codificante l'integrasi (*intI2**), il cui prodotto presenta una omologia del 40% con quello dell'integrasi di tipo 1. Essi sono stati trovati nella famiglia dei trasposoni Tn7 e sono stati associati con la resistenza al trimethoprim (Recchia e Hall, 1995).

Figura 1. Rappresentazione schematica dell'inserzione di una cassetta circolare in un integrone di tipo 1



intI1: gene codificante l'integrasi di tipo 1 (Int1).

attC: elemento di ricombinazione della cassetta genica noto come *elemento di 59 basi*.

attI: sito di inserzione.

qacEΔ1: allele del gene *qacE1* che conferisce resistenza ai composti ammonio quaternari e all'etidio bromuro.

sull: gene che conferisce resistenza alle sulfonamidi.

Le frecce indicano i primers (5'CS, 3'CS e Sull) utilizzati in questo lavoro per amplificare la regione variabile.

Il disegno non è in scala.

Altri tipi di integrasi sono stati descritte in *Serratia marcescens* e *Pseudomonas aeruginosa* (Arakawa et al., 1995; Senda et al., 1996), in *Vibrio cholerae* (Mazel et al., 1998; Heidelberg et al., 2000) e in *Vibrio mimicus* (Clark et al., 2000). I corrispondenti integroni sono stati denominati di tipo 3, 4, e 5. La loro diffusione tra le altre specie batteriche è ancora da definire. Recentemente, altre quattro differenti integrasi sono state descritte in campioni ambientali (Nield et al., 2001). La maggior parte delle cassette geniche veicolate dagli integroni delle prime tre classi contiene determinanti di antibiotico resistenza, così che tali elementi genetici sono paragonati ad un sistema di clonazione naturale, che permette l'acquisizione e l'excisione di geni per la resistenza (Recchia e Hall, 1995).

La presenza degli integroni di tipo 1 e 2 è stata già descritta nei membri appartenenti al genere *Acinetobacter*, di derivazione sia clinica (Vila et al., 1997; Seward et al., 1998; Seward e Towner, 1999; Ploy et al., 2000; Ramirez et al., 2000; Riccio et al., 2000; Gallego e Towner, 2001; Koeleman et al., 2001; Chu et al., 2001; Oh et al., 2002; Yum et al., 2002), che ambientale (Petersen et al., 2000). La presenza di integroni di tipo 3, invece, non è stata mai riscontrata (Ploy et al., 2000; Seward e Towner, 1999). In particolare, la presenza degli integroni di tipo 1 è stata rilevata con frequenza elevata in isolati clinici di *A. baumannii*, (Ploy et al., 2000; Seward e Towner, 1999; Gallego e Towner, 2001; Koeleman et al., 2001), mentre solo uno studio (Gonzales et al., 1998) ha trovato un'elevata frequenza di integroni di tipo 2 negli isolati clinici di ospedali cileni. Tuttavia, nonostante molti lavori indichino la frequente presenza di tali elementi genetici in *A. baumannii*, specialmente in isolati multiresistenti con un'origine epidemica (Koeleman et al., 2001), in pochi di questi è stata eseguita una caratterizzazione molecolare delle cassette inserite (Seward e Towner, 1999; Ploy et al., 2000; Riccio et al., 2000; Petersen et al., 2000). Quest'ultime sono risultate vettori soprattutto di determinanti genetici che conferiscono resistenza ad aminoglicosidi (Seward et al., 1998; Seward e Towner, 1999; Ploy et al., 2000; Riccio et al., 2000; Gallego e Towner, 2001) ed a β -lattamici (Vila et al., 1997; Ploy et al., 2000; Riccio et al., 2000; Yum et al., 2002) mentre in soli due casi è stata trovata una cassetta codificante la resistenza al trimethoprim (Ploy et al., 2000; Petersen et al., 2000). Frequenti sono risultate anche cassette a funzione sconosciuta (Seward e Towner, 1999; Petersen et al., 2000).

1.6 Pompe di efflusso

La multiresistenza nei batteri Gram negativi è imputabile a più meccanismi, che possono agire sinergicamente o indipendentemente l'uno dall'altro. Le antibiotico-resistenze, ad esempio, possono dipendere contemporaneamente sia da un'alterata permeabilità della membrana esterna che dall'overespressione di sistemi di pompe di efflusso (Nikaido, 1998). Questi ultimi possono espellere dalla cellula batterica una grande varietà di composti strutturalmente differenti determinando nei batteri una resistenza intrinseca nei confronti non solo di un gran numero di chemioterapici, ma anche di detergenti, coloranti e composti organici (Poole, 2001). Sono state descritte, fino a questo momento, 5 classi di sistemi (Webber e Piddock, 2003). Il più importante, associato all'antibiotico-resistenza in molti batteri Gram negativi, è caratterizzato da tre componenti proteiche che interagiscono fra loro: un trasportatore appartenente alla famiglia RND (*Resistance-Nodulation-cell Division*) localizzato a livello della membrana interna, una proteina di fusione a localizzazione periplasmica (MFP, *Membrane Fusion Protein*) ed una proteina canale facente parte della membrana esterna (OMF, *Outer Membrane Factor*). Questa organizzazione strutturale permette l'espulsione dei farmaci direttamente all'esterno della cellula, senza accumulo nello spazio periplasmico. I trasportatori RND sono trasportatori antiporto che sfruttano il gradiente protonico come forza motrice. Il meccanismo tramite cui riconoscono i substrati rimane sconosciuto. Tutti e tre i componenti del sistema sono spesso codificati dallo stesso cluster genico (Zgurskaya e Nikaido, 2000).

L'importanza di tale meccanismo di resistenza in *Acinetobacter baumannii* è emersa solo recentemente (Magnet et al., 2001; Ribera et al., 2002; Vila e Marco, 2002). Si è rilevato, infatti, che i pattern di resistenza riscontrati in alcuni isolati clinici nei confronti degli aminoglicosidici (Magnet et al., 2001) e dei fluorochinoloni erano atipici (Ribera et al., 2002; Vila e Marco, 2002). Essi non potevano essere determinati esclusivamente, nel primo caso, dall'attività di enzimi in grado di modificare l'antibiotico e, nel secondo caso, da mutazioni nelle topoisomerasi. Queste osservazioni hanno così portato alla scoperta del primo sistema di espulsione attiva codificato dall'operone *adeABC* (Magnet et al., 2001). E' un sistema a tre componenti proteiche caratterizzato da un trasportatore RND, antiporto-protone dipendente, in grado di riconoscere aminoglicosidi,

fluorochinoloni, cefotaxime, eritromicina, tetraciclina, cloramfenicolo e trimethoprim. Non si esclude, tuttavia, la presenza di ulteriori sistemi (Ribera et al., 2002).

1.7 Scopo della ricerca

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di acquisire informazioni sulla diffusione e sulla distribuzione di antibiotico-resistenze nel genere *Acinetobacter* e sui meccanismi di acquisizione di tali resistenze. Infatti, come emerge dalla letteratura, tali batteri, per quanto riguarda le specie cliniche, sono caratterizzati da un'elevata resistenza agli antibiotici, che è notevolmente incrementata negli ultimi 30 anni. Si ipotizza quindi che tali resistenze possano derivare dall'acquisizione per via orizzontale dei determinanti genici corrispondenti. Tuttavia poco è noto sui meccanismi di tale acquisizione e sull'origine dei determinanti stessi. Certamente, alcuni geni sono stati acquisiti da *Enterobacteriaceae*, come è dimostrato dall'omologia della sequenza dei geni che conferiscono resistenza ad aminoglicosidi. Poco si sa invece, sul ruolo che potrebbe essere svolto in questo ambito da specie di *Acinetobacter* di derivazione prevalentemente ambientale. In ambienti come il suolo o i fanghi di un depuratore, entrambi noti per l'abbondante presenza di *Acinetobacter*, potrebbe essere favorita la selezione di ceppi resistenti, i quali potrebbero poi fungere da serbatoi di geni R per ceppi di importanza clinica.

Per tali motivi, si è voluta studiare la distribuzione delle resistenze tra le diverse genomospecie, provenienti da fonti ambientali diverse. Per comprendere il fenomeno della multiresistenza, il lavoro di ricerca è quindi proseguito con lo studio della diffusione degli integroni di tipo 1 e 2 (i tipi maggiormente diffusi tra i batteri Gram negativi) e della loro importanza quali vettori nella trasmissione delle antibiotico resistenze nel genere *Acinetobacter*. A tal fine sono stati determinati la frequenza, la localizzazione ed il tipo di cassette degli integroni stessi.

Inoltre è stato iniziato uno studio riguardante la valutazione della presenza e dell'attività, in alcuni ceppi multiresistenti, di sistemi di pompe di efflusso.

2. MATERIALI e METODI

2.1 Ceppi batterici e Coltura

In questo lavoro sono stati analizzati isolati di *Acinetobacter* di origine sia clinica che ambientale.

I ceppi clinici sono stati isolati da materiali clinici diversi, raccolti tra il 1989 e il 2000. Essi provengono dagli ospedali di 6 diverse città italiane: Trieste, Udine, Aviano, Padova, Roma, Verona, e sono stati gentilmente forniti rispettivamente dai proff. C. Monti-Bragadin (Università di Trieste), P. Lanzafame (Ospedale di Udine), P. De Paoli (CRO, Aviano), E. A. Tonin (Università di Trieste), G. Satta (Università La Cattolica, Roma) e G. M. Rossolini (Università di Siena).

La loro identificazione preliminare è stata eseguita con i metodi di routine in uso in ciascuno degli enti di provenienza. Gli isolati non risultavano epidemiologicamente correlati, tranne per 4 ceppi appartenenti ad una piccola epidemia avvenuta nel 1996 nell'Ospedale di Trieste.

I ceppi ambientali sono stati isolati da 66 campioni di diversa natura (acqua dolce, acqua salata, acqua mista a terra, terra, peli di animale, polvere, fanghi attivi di depuratori) raccolti tra aprile 2000 e gennaio 2002. Essi provengono dalla regione Friuli-Venezia-Giulia, dalle valli di Comacchio (provincia di Ferrara) e dalla Nigeria. Isolati con terreni appropriati, sono stati identificati secondo quanto descritto nei paragrafi successivi.

Come controlli, sono stati inoltre usati i seguenti ceppi di riferimento: ATCC 23055^T (genomospecie 1); ATCC 19606^T (genomospecie 2); ATCC 19004 (genomospecie 3); ATCC 17906^T (genomospecie 4); ATCC 17908^T (genomospecie 5); ATCC 17979 (genomospecie 6); ATCC 17909^T (genomospecie 7); ATCC 15309^T (genomospecie 8); ATCC 9957 (genomospecie 9); ATCC 17924 (genomospecie 10); ATCC 11171 (genomospecie 11); CIP 103788^T (genomospecie 12); ATCC 17903 (genomospecie 13).

Ove non altrimenti indicato, i ceppi sono stati coltivati in terreno LB (Luria Bertani), incubando a 37°C i ceppi clinici e a 30°C i ceppi ambientali.

Isolamento di ceppi ambientali

Il primo passaggio nell'isolamento dei ceppi è consistito nel seminare i campioni ambientali nel terreno di arricchimento di Baumann (Baumann, 1968). Esso è caratterizzato da pH acido (pH 6), da acetato come unica fonte di carbonio, e nitrato come fonte di azoto, tutte condizioni favorevoli alla crescita di membri del genere *Acinetobacter* (Baumann, 1968). Dopo la semina i campioni sono stati incubati per 48 ore a 30°C in vigorosa agitazione (200rpm). Successivamente, sulla base della torbidità della coltura ottenuta, sono state seminate diluizioni scalari della stessa in terreno LAM (Leeds *Acinetobacter* Medium) (Jaward et al., 1994). Questo è un terreno selettivo e differenziale per la presenza rispettivamente di tre antibiotici e dell'indicatore rosso fenolo. Dopo due giorni di incubazione a 30°C, da ciascuna piastra, un paio di colonie di morfologia adeguata (colonie rosa opaco, circolari, lisce) che avevano determinato l'alcalinizzazione del terreno, con conseguente viraggio dell'indicatore dall'arancio al colore malva, sono state isolate su terreno LB. Su queste sono stati eseguiti test fenotipici preliminari per individuazione di batteri appartenenti al genere *Acinetobacter*: il test della citocromo ossidasi ed il test della catalasi (Bergogne-Bérénzin e Towner, 1996).

2.2 Identificazione del genere

L'inequivocabile appartenenza degli isolati al genere *Acinetobacter* è stata stabilita mediante test di trasformazione di Juni (Juni, 1972). Questo test consiste nel trasformare, con DNA proveniente dal ceppo che si vuole identificare, un mutante di *Acinetobacter* auxotrofo per il triptofano (BD413). Il ricevente viene convertito alla prototrofia solo se il donatore è dello stesso genere.

Identificazione di *Acinetobacter* mediante test di trasformazione di Juni

Alcune colonie del ceppo BD413

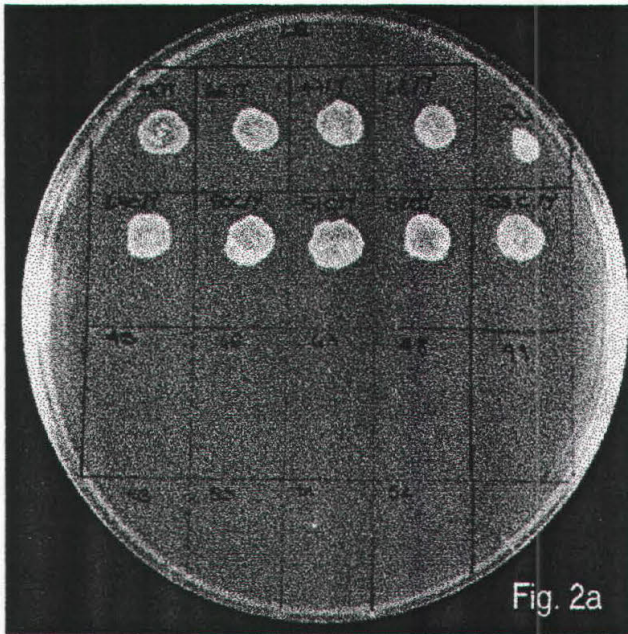


Fig. 2a

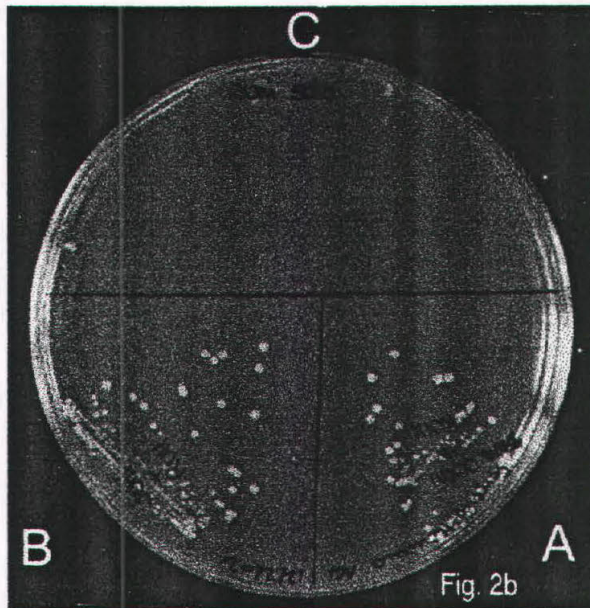


Fig. 2b

Figura 2. Esempio di test di trasformazione di Juni (Juni, 1972)

Una piastra di LB è stata suddivisa in 20 riquadri. Nei primi 10 di questi (Fig.2a, metà superiore della piastra) è stato seminato il ceppo auxotrofo BD413*trpE27*, insieme ad una piccola quantità di DNA genomico di 10 isolati (un isolato diverso per ogni riquadro). Dopo incubazione overnight., si è avuta crescita di BD413*trpE27* trasformato. Nei 10 riquadri nella metà inferiore della piastra sono stati effettuati i controlli di sterilità degli estratti di DNA. Due trasformati sono stati quindi trasferiti su terreno privo di triptofano per controllare l'avvenuto ritorno alla prototrofia per questo amminoacido (Fig.2b, A e B). Il ceppo BD413 *trpE27* a cui non era in precedenza stato aggiunto alcun DNA funge da controllo negativo (Fig.2b, C).

Sulla stessa piastra sono stati depositati, separatamente, colonie del ricevente, come controllo negativo, e la preparazione di DNA per il controllo di sterilità. (Fig. 2a, metà inferiore della piastra). Dopo incubazione overnight (o.n.), si è avuta la crescita di BD413*trpE27* trasformato. Per confermare l'avvenuto ritorno alla prototrofia per il triptofano, i presunti trasformati sono stati seminati su terreno minimo (Vogel-Bonner 1X), contenente citrato come fonte di carbonio (Maron e Ames, 1983) (Fig.2b, A e B). Il ceppo BD413*trpE27*, a cui in precedenza non era stato aggiunto alcun DNA, funge da controllo negativo (fig.2b,C).

Identificazione di *Acinetobacter* mediante sonda Aci0

La sonda Aci0 è un oligonucleotide di 24 basi (5'-ATCCACAACAAGTTGTTCTTCATA-3'), complementari ad una sequenza altamente conservata nel genere *Acinetobacter*, compresa tra l'estremità 3' del gene che codifica l'rRNA 16S e l'estremità 5' del gene che codifica tRNA^{Ile} (Lagatolla et al., 1998).

L'oligonucleotide, sintetizzato e purificato dalla ditta Sigma Genosys, è stato marcato usando il DIG-(digossigenina) oligonucleotide 3'-end-labelling kit (Roche GmbH, Mannheim, Germany).

Lo screening dei campioni è stato fatto utilizzando la tecnica del dot-blot, seguendo la procedura descritta da Lagatolla (Lagatolla et al., 1998).

2.3 Estrazione di DNA genomico

L'estrazione del DNA genomico è stata eseguita seguendo la metodica precedentemente descritta (Dolzani et al., 1995). Le cellule batteriche di una coltura o.n. (500µl), sono state incubate un'ora in tampone contenente lisozima (1mg/ml) e quindi lisate in presenza di SDS (0.5%) e di Proteinasi K (100µg/ml). Il DNA è stato quindi purificato mediante una o due estrazioni con fenolo-cloroformio-alcol isoamilico (25:24:1), precipitato con etanolo assoluto ed infine risospeso in TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM).

2.4 Identificazione di specie

Di tutti i ceppi è stata eseguita l'identificazione della genomospecie mediante la tecnica denominata ARDRA (*Amplified Ribosomal Restriction Analysis*) (Dijkshoorn et al., 1998). Mentre, solo per alcuni isolati, è stata eseguita anche l'identificazione mediante PCR-ribotyping (Dolzani et al., 1995).

Le tecniche si basano sull'analisi di restrizione rispettivamente della regione di DNA codificante l'rRNA 16S (Dijkshoorn et al., 1996) e di quella spaziatrice compresa tra i geni degli rRNA 16S e 23S (Dolzani et al., 1995). In entrambi i casi si ottengono profili di restrizione caratteristici delle diverse genomospecie.

ARDRA

La regione di DNA codificante l'rRNA 16S, amplificata utilizzando due primers universali (Vaneechoutte et al., 1995), il 16Sforward (5'-TGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGC-3') ed il 16Sreverse (5'-TACCCTGTTACGACTTCACCCCA-3'), ad una temperatura di annealing di 57°C, è stata digerita con le seguenti endonucleasi: *AluI*, *CfoI*, *MboI*, *RsaI*, *MspI* (Roche Diagnostic, Milano, Italia), *BfaI*, *BsmI* (New England Biolabs), rispettando le condizioni consigliate dalle ditte fornitrici. I frammenti di digestione sono stati separati in gel di agarosio al 2% in TAE 1X ed i pattern ottenuti sono stati confrontati con quelli descritti in letteratura (Dijkshoorn et al., 1998; Seifert et al., 1997; Nemeč et al., 2000; Nemeč et al., 2001, Vaneechoutte et al., 1999). Ad ogni isolato analizzato è stata quindi assegnata una particolare combinazione numerica, che identifica il profilo di restrizione ottenuto con ciascuno degli enzimi citati. Le combinazioni numeriche identificano le specie.

PCR-ribotyping

La regione spaziatrice compresa tra i geni codificanti gli rRNA 16S e 23S è stata amplificata con la coppia di primers P1 (5'-TTGTACACACCGCCCGTCA-3') e P2 (5'-GGTACTTAGATGTTTCAGTTC-3') (Kostman et al., 1992) utilizzando una temperatura di annealing di 55°C (Dolzani et al., 1995). Gli amplificati sono stati digeriti con gli enzimi di restrizione *AluI* e *NdeII* (Roche Diagnostic, Milano, Italia). I frammenti di digestione sono stati separati in gel di agarosio al 4% in

TAE 1X ed i pattern ottenuti sono stati confrontati con quelli pubblicati (Dolzani et al., 1995).

2.5 Test fenotipici

I ceppi ambientali di *Acinetobacter* sono stati caratterizzati utilizzando 15 test fenotipici. Questi sono stati scelti confrontando le batterie di test proposte da più autori: Bouvet e Jeanjean (1995), Tjernberg e Ursing (1989), Kämpfer et al. (1993), Bouvet e Grimont (1986), Gerner-Smidt et al. (1991), Nemeč et al. (2001), Vaneechoutte et al. (1999), scegliendo quelli più discriminanti, per i quali fossero descritte le percentuali di positività di tutte o quasi le genomospecie note.

I test sono stati eseguiti secondo quanto indicato da Bouvet e Grimont (1986) con alcune modifiche.

Test di crescita a diverse temperature

I ceppi sono stati fatti crescere o.n. a 30°C in 2 ml di terreno BHI (Brain Heart Infusion). Il giorno dopo, 10 µl di tale coltura sono stati diluiti in 2 ml di terreno fresco (BHI) ed incubati, in bagnetti termostatici, alle temperature di 37°C, 41°C e 44°C.

Test di acidificazione in presenza di glucosio

E' stato utilizzato il terreno Bacto OF Basal Medium-Dehydrated (Difco) preparato come indicato dalla ditta produttrice, con l'aggiunta di D-glucosio all'1%. I ceppi sono stati seminati per infissione ed incubati per 6 giorni. Gli isolati positivi al test, che ossidano il glucosio per la produzione di una aldoso deidrogenasi, determinano acidificazione del terreno e quindi viraggio dell'indicatore presente nel terreno dal verde al giallo.

Test di idrolisi della gelatina

Un'ansata di brodocoltura o.n. è stata depositata su piastre di Tryptic Soy Agar (Difco) addizionate di gelatina (Bacteriological gelatin, BBL) al 4%. Dopo 3 giorni di incubazione, le colture sono state trattate con il reagente di Frazier (15% HgCl₂ in 20% di HCl) e quindi esaminate per verificare la presenza di zone di idrolisi.

Test di emolisi

I ceppi sono stati seminati su piastre di agar sangue (Columbia blood sheep agar, Biomérieux) ed incubati per un minimo di due giorni. Come controllo positivo è stato utilizzato il ceppo ATCC 17906^T (genomospecie 4).

Test di utilizzo di substrati come fonti di Carbonio

I substrati saggiati sono stati i seguenti: L-leucina (Sigma), L-fenilalanina (Merck), L-triptofano (Merck), acido azelaico (Sigma), β -alanina (Fluka, Chemika), acido glutarico (Fluka, Chemika), acido malonico (Fluka, Chemika), DL-acido lattico (Sigma), acido citrico (Carlo Erba). Le soluzioni dei substrati utilizzati, sterilizzate per filtrazione, sono state aggiunte alla concentrazione finale dello 0.2% al terreno minimo di Kämpfer (Kämpfer e Atwegg, 1992), leggermente modificato. La composizione del terreno modificato è riportata di seguito: K_2HPO_4 (1,74 g/l); KH_2PO_4 (1,36 g/l); $(NH_4)_2SO_4$ (5 g/l); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,5 g/l); $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,1 g/l); NaCl (9 g/l); estratto di lievito (0.001g/l) (Difco) e peptone (0.001g/l) (Difco).

Per il solo test dell'acido citrico, è stato utilizzato il terreno di Vogel-Bonner (Maron e Ames, 1983), che contiene il substrato alla concentrazione richiesta. Provette contenenti 3 ml di terreno sono state inoculate con 5 μ l di una coltura o.n., incubate a 30°C e controllate quotidianamente per 6 giorni.

2.5.1 Identificazione fenotipica

I risultati dei test fenotipici sono stati registrati e quindi analizzati al computer. A tal fine, è stata costruita una matrice di dati comprendente le percentuali di positività ai test da noi utilizzati relativi a tutte le genomospecie finora note. Tale matrice è stata ottenuta utilizzando i dati pubblicati da Bouvet e Grimont (1986) e Gerner-Smidt et al. (1991) per il complesso *A. calcoaceticus*-*A. baumannii*; da Bouvet e Jeanjean (1995) per le genomospecie dalla 13BJ alla 17BJ; da Tjernberg e Ursing (1989) per le genomospecie 13TU-15TU; da Nemeč et al. (2000 e 2001) per *A. ursingii* e *A. schindleri*; ed infine quelli da Vaneechoutte et al. (1999) per *A. venetianus*. I dati relativi alle genomospecie 4-12, reperibili in più lavori, sono stati ottenuti considerando complessivamente i lavori di Bouvet e Jeanjean (1995), Tjernberg e Ursing (1989), Kämpfer et al. (1993), Bouvet e Grimont (1986),

Gerner-Smidt et al. (1991), ricalcolando le percentuali di positività sulla base del numero complessivo di isolati analizzati nei diversi studi.

E' stata quindi calcolata la probabilità (Lapage et al., 1973) che ciascun isolato appartenesse ad una delle genomospecie note, utilizzando un programma appositamente scritto dal prof. C. Monti-Bragadin (Università di Trieste).

2.6 Clonazione e sequenziamento del gene codificante l'rRNA16S del ceppo 28C

Il gene codificante l'rRNA 16S dei ceppi 28C è stato clonato nel plasmide pCR 2.1, utilizzando il kit TA Cloning[®] (Invitrogen). Il vettore, che viene fornito linearizzato, è caratterizzato dalla presenza di una deossitimidina alle estremità 3' e dai geni per la β -galattosidasi (*lacZ*), per la resistenza ad Ampicillina e Kanamicina, come marcatori. Il gene codificante l'rRNA 16S è stato amplificato utilizzando la Platinum[®]Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen), una miscela di due enzimi (*Taq* DNA polimerasi e polimerasi termostabile da *Pyrococcus species* GB-D) che assicurano un'alta fedeltà alla reazione. Sono stati utilizzati i primers 16Sfor e 16Srev (Vanechoutte et al., 1995) alla temperatura di annealing di 57°C e di estensione di 68°C. La miscela di ligazione è stata preparata mantenendo un rapporto di ligazione 1:3 tra vettore ed inserto, in presenza della DNA Ligasi T4 (4.0 Weiss units). La reazione è stata condotta o.n. a 14 °C.

La trasformazione è stata effettuata utilizzando le cellule competenti INV α F' [genotipo: F' *endA1 recA1 hsdR17* (r_k^- , m_k^+) *supE44 thi-1 gyrA96 relA1* $\Phi 80lacZAM15 \Delta(lacZYA-argF)U169\lambda$]. I ceppi trasformati sono stati selezionati su piastre di LB contenenti 100 μ g/ml di ampicillina. Su ciascuna piastra sono stati distribuiti 40 μ l del substrato cromogenico Blu-Gal (5-bromo-3-indolil- β -D-galattopiranoside, Sigma) alla concentrazione di 10mg/ml. Questo substrato permette di distinguere le cellule aventi il gene *lacZ* integro da quelle aventi il gene interrotto dall'inserto clonato. Le prime, grazie all'attività della β -galattosidasi, risultano blu mentre le seconde bianche.

10 colonie bianche sono state, quindi, isolate su LB + ampicillina (100 μ g/ml). I plasmidi sono stati estratti mediante lisi alcalina (Birmboim e Doly, 1979) e

sottoposti ad analisi di restrizione con l'enzima *EcoRI*, che presenta due siti di taglio adiacenti al sito di clonazione, per verificare la presenza di un inserto di dimensioni appropriate.

Sequenziamento

Le reazioni di sequenza sono state effettuate utilizzando il Thermo Sequenase Cy5 Dye Terminator Cycle Sequencing Kit dell'Amersham Pharmacia Biotech. Viene sfruttato il principio di Sanger, incorporando Cy5-ddNTP nella miscela di reazione. I primers utilizzati per il sequenziamento sono l'M13 -40Forward (5'-GTTTCCAGTCACGACGTTGTA-3', questa tesi) ed il primer universale M13Reverse (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'), fornito dal kit, complementari a sequenze del plasmide fiancheggianti il sito di clonazione.

Per sequenziare sono stati utilizzati il Sequenziatore automatico Alf Express (Pharmacia Biotech) ed il programma ALFwin sequence Analyser 2.11. Il gel di poliacrilammide all'8% (Repro Gel™ High Resolution-Amersham Pharmacia Biotech), è stato preparato con spacer da 0.5 mm.

I dati ottenuti sono stati confrontati con le sequenze depositate in EMBL/Genbank usando il programma BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) disponibile in rete.

2.7 Valutazione dell'antibiotico-resistenza

Diffusione in agar

La suscettibilità agli antibiotici è stata determinata mediante il metodo della diffusione in agar, seguendo le linee guida (NCCLS, 2000) e le tabelle di riferimento (NCCLS, 2001) del National Committee for Clinical Laboratory Standards, USA.

Come ceppi di controllo sono stati utilizzati *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218 e *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Gli antibiotici saggiati sono stati i seguenti: amikacina (30µg); tobramicina (10µg); netilmicina (30µg); gentamicina (10µg); trimethoprim-sulfametossazolo (1.25/23.75µg); ceftazidime (30 µg); cloramfenicolo (30 µg); ceftriaxone (30µg); cefotaxime (30 µg); ampicillina (10 µg); ampicillina-sulbactam; piperacillina

(100 µg); ciprofloxacina (5 µg); imipenem (10 µg); piperacillina-tazobactam (100/10µg); cefepime (30 µg); aztreonam (30 µg); streptomina (10µg) (Oxoid Spa, Milano, Italia).

MIC (Minima Concentrazione Inibente)

Sono state determinate le MIC in terreno solido per ciprofloxacina (Bayer), cloramfenicolo (Sigma) ed aztreonam (Sigma), seguendo le direttive dell'NCCLS. Questi tre antibiotici sembrano essere substrati del sistema di pompa di efflusso *adeABC* recentemente scoperto in *Acinetobacter baumannii* (Magnet et al., 2001). Le MIC sono state determinate in presenza ed assenza di MC-207,110 (20mg/l), un inibitore di sistemi di pompe di efflusso, fornito dalla Sigma come phe-arg-β-naftilamide. Sono stati analizzati gli isolati di *Acinetobacter baumannii* che, con il metodo della diffusione in agar, sono risultati resistenti agli antibiotici citati.

2.8 Screening per la presenza del gene *intI1*

Lo screening per la presenza del gene dell'integrasi di tipo 1 (IntI1) è stato fatto su tutti i ceppi dello studio mediante la tecnica del dot-blot.

La sonda è stata preparata amplificando, in presenza di digossigenina-11-dUTP 70µM (corrispondente a circa il 30% della dTTP presente nel saggio; Lion e Haas, 1990), un frammento di 249pb del gene *intI1*, utilizzando come stampo DNA del plasmide R46 (Recchia et Hall, 1995). I primers utilizzati, denominati Int2F (5'-TCTCGGGTAACATCAAGG-3'; Martinez-Freijo et al., 1998) e Int2R (5'-TGGCTTCAGGAGATCGGA-3'; Gombac et al., 2002) mappano rispettivamente nelle regioni comprese dai nucleotidi 756-733 e 1005-988 della sequenza depositata in GenBank (M95287) del plasmide R46. Per l'amplificazione è stata utilizzata una temperatura di annealing di 55°C.

La sonda ottenuta, infine, è stata purificata mediante colonnina cromatografica (MicroSpinTM S-400 HR Columns, Amersham Pharmacia Biotech Inc, Milano, Italia).

L'esperimento di dot-blot è stato così condotto: 500ng di DNA purificato sono stati depositati su una membrana di Nylon (HybondN+-Amersham Pharmacia Biotech, Upsala, Sweden), fissati agli UV ed ibridati overnight a 64°C con la

sonda per l'integrasi di tipo 1 (IntI1). I segnali di ibridazione sono stati rilevati dalla reazione colorimetrica determinata dalla fosfatasi alcalina coniugata all'anticorpo anti-digossigenina in presenza di NBT (cloruro di nitroblu tetrazolio) e X-Fosfato (5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato), come descritto nel manuale della ditta che produce il sistema (The DIG System User's Guide for Filter Hybridization, Boehringer Mannheim, 1993).

I campioni risultati positivi sono stati ulteriormente analizzati per avere informazioni sulla grandezza della regione variabile, sul numero delle copie del gene dell'integrasi e sulla localizzazione di quest'ultimo.

2.9 Amplificazione della regione variabile dell'integrone di tipo 1

La regione variabile degli integroni di tipo 1 è stata amplificata utilizzando due oligonucleotidi complementari alle due regioni conservate, note come 5'CS e 3'CS, fiancheggiando il sito di ricombinazione *attI* (Figura 1). I primers (Lévesque et al., 1995), denominati 5'CS (5'-GGCATCCAAGCAGCAAG-3') e 3'CS (5'-AAGCAGACTTGACCTGA-3'), mappano rispettivamente nella regione compresa tra i nucleotidi 1342-1358 e 4422-4406 relativi alla sequenza del plasmide R46 precedentemente citata (numero di accesso EMBL/GenBank: M95287). Il profilo di amplificazione utilizzato è caratterizzato da una temperatura di annealing di 52°C ed una fase di allungamento a 72°C della durata di 5' con incremento di 5" ad ogni ciclo. I prodotti di amplificazione sono stati analizzati in elettroforesi in gel di agarosio all'1% in TAE 1X.

Le stesse condizioni di amplificazione sono state utilizzate anche con la coppia di primers 5'CS e Sull (5'-TGAAGGTTTCGACAGCAC-3'; Lévesque et al., 1995). Quest'ultimo oligonucleotide è complementare a 17 basi (nucleotidi 5399-5383 della sequenza M95287) facente parte del gene *sull* localizzato nella regione conservata al 3' che caratterizza gli integroni di tipo 1 (Figura 1).

2.10 Analisi di restrizione della regione variabile degli integroni di tipo 1

10 µl di amplificato sono stati digeriti con 10U di *AluI* o *MspI* (Roche Diagnostics, Milano, Italia). I frammenti di restrizione ottenuti sono stati separati in gel di agarosio al 2% in TAE 1X.

2.11 Sequenziamento della regione variabile degli integroni di tipo 1

Le sequenze della regione variabile degli integroni di tipo 1 sono state eseguite dalla dott.ssa M. L. Riccio, presso il laboratorio di Biologia Molecolare, Sez. di Microbiologia, Università di Siena.

Il sequenziamento degli inserti di 2.2 Kb (ceppo 200A) e 0.8 Kb (ceppo 204A) è stato ottenuto partendo da estratti di DNA genomico, mentre per quello di 2.5 Kb (ceppo AC-54/97) è stato analizzato il plasmide pMLR54G, in cui è stata clonata una copia dell'integrone in questione (Riccio et al, 2000).

I numeri di accesso delle sequenze depositate in EMBL/GenBank sono: AJ310480 (regione variabile di 2.5 Kb); AJ319747 (regione variabile di 2.2 Kb) e AJ313334 (regione variabile di 0.8 Kb).

2.12 Ricerca del gene *intI2**

Il gene *intI2** è stato ricercato nei ceppi di *Acinetobacter baumannii* mediante amplificazione genica. Come primers sono stati utilizzati due oligonucleotidi di 30 basi: pint7 (5'-GCGATATTGATTATATCCCTGCAAGCAAGC-3'; Heikkilä et al., 1991) e pint7F (5'-GATTAGGCGCGTGGGCAGTAGGCTGTTTCT-3'; questa tesi), complementari alla regione compresa tra i nucleotidi 1649-1620 e 1393-1422 della sequenza del trasposone Tn7 disponibile in GenBank (AJ001816). La temperatura di annealing utilizzata è stata di 60°C.

Come frammento amplificato, dopo 40 cicli di amplificazione, è attesa una banda di 257pb.

2.13 Ribotipizzazione

La tipizzazione di 40 ceppi di *Acinetobacter baumannii* è stata eseguita mediante la metodica descritta da Gerner-Smidt (Gerner-Smidt, 1992).

2 µg di DNA sono stati digeriti separatamente con tre enzimi di restrizione (*EcoRI*, *SalI* e *ClaI*, Roche Diagnostic, Milano, Italia.). I frammenti di restrizione ottenuti sono stati separati in un gel di agarosio allo 0.8% in TAE 1X a 5 V/cm, trasferiti per capillarità su membrana di Nylon (Hybond-N+, Amersham Pharmacia Biotech, Milano, Italia) ed infine ibridati con una sonda marcata con digossigenina. La sonda, costituita da cDNA ottenuto con il metodo del random priming, retrotrascrivendo una miscela di rRNA 16S e 23S di *E. coli* in presenza di digossigenina-11-dUTP, è stata poi purificata seguendo la linee guida della ditta produttrice del desossinucleotide marcato (The DIG System User's Guide for Filter Hybridization, Boehringer Mannheim, 1993). L'ibridazione è stata condotta o.n. alla temperatura di 60°C e le bande ibridate sono state rilevate con il metodo colorimetrico descritto in precedenza. La reazione di colorazione è stata fermata dopo 12-24 ore lavando la membrana in TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8) ed utilizzando sempre questa soluzione per la conservazione della stessa a 4 °C. I pattern di bande ottenuti con ciascun enzima sono stati analizzati con il *software* GelCompar II (Applied Math, Kortrijk, Belgio). L'analisi di somiglianza tra tracciati diversi è stata condotta sulla base della presenza o meno di bande con la stessa mobilità elettroforetica (*matching*) nei diversi tracciati. E' stato applicato un valore di tolleranza pari a 1,5% (espresso come % della lunghezza totale dei tracciati).

La somiglianza è stata calcolata utilizzando il coefficiente di Dice (Dice, 1945), secondo la formula

$$S = 2m/a+b$$

dove, per 2 tracciati j e k, si definiscono:

m = numero di bande nella stessa posizione, con i limiti di tolleranza specificati

a, b = numero di bande nei tracciati j e k, rispettivamente.

I dati ottenuti, salvati come matrice, sono stati analizzati mediante UPMGA per ottenere i diversi raggruppamenti.

Due o più isolati sono stati inclusi nello stesso ribotipo, quando il valore del coefficiente di somiglianza era uguale o superiore a 0.85. Questo valore corrisponde ad una differenza tra due pattern nella posizione di un massimo di tre bande.

2.14 Localizzazione degli integroni di tipo 1

Al fine di determinare la localizzazione degli integroni, sono state utilizzate due metodiche.

1. Il DNA genomico totale è stato separato in gel di agarosio allo 0.7% in TAE 1X per 22h a 1,6V/cm, condizioni queste che permettono di separare il DNA cromosomico da eventuali plasmidi molto grandi (Riccio et al., 2001). Dopo trasferimento su membrana di Nylon, il DNA è stato ibridato con la sonda per il gene *intI1*.
2. Per mappare più finemente la localizzazione dell'integrone, il DNA genomico è stato digerito con *I-CeuI*, un enzima che taglia in corrispondenza di una sequenza di 26 basi situata all'interno del gene codificante l'rRNA 23S. I frammenti di restrizione ottenuti sono stati separati mediante PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) e trasferiti su membrana di Nylon, seguendo la procedura descritta per il Southern blot in precedenza. Il tempo di depurinazione in HCl 0.2M è stato però prolungato a 30'. E' stata, quindi, eseguita una prima ibridazione con la sonda per i geni rRNA 16S e 23S (la stessa usata per il ribotipo, vedi paragrafo corrispondente), che riconosce tutte le bande di DNA di derivazione cromosomica e poi, dopo strippaggio, una seconda ibridazione usando la sonda per il gene dell'integrasi di tipo 1 (*IntI1*). Il confronto tra i segnali ottenuti nelle due ibridazioni permette di stabilire con certezza la localizzazione dell'integrone (Bonnet et al, 2002).

I campioni sono stati preparati nel seguente modo: le cellule batteriche (500µl) di una coltura o.n. sono state lavate due volte prima con acqua sterile e poi con Tris-HCl 10mM ed EDTA 5mM pH7.5 (TE). Sono state, quindi, risospese in 200 µl di TE a cui è stato aggiunto un uguale volume di agarosio low-melting (SeaPlaque GTG, BMA) al 2% sciolto nel medesimo tampone appena citato. Gocce di questa miscela da 25 µl sono state lasciate a solidificare a 4°C e quindi incubate o.n. a

55°C nella soluzione di lisi ESP (0.5 M EDTA pH8; 10% N-Lauril sarcosina e 1 mg/ml di proteinasi K). La proteasi è stata quindi allontanata lavando ripetutamente per due giorni le gocce di agarosio nella soluzione di TE. In tale soluzione i preparati possono venire conservati per mesi.

Una goccia per campione è stata preincubata in 500 µl di tampone specifico per l'enzima e poi incubata in 100 µl di tampone fresco contenente 20U di I-CeuI (New England Biolabs) a 37°C per 3 ore per digerire il DNA incluso. L'attività enzimatica è stata successivamente fermata aggiungendo 200 µl di soluzione ESP ed incubando il tutto a 55°C per 15 minuti. Le gocce, infine, sono state lavate due volte nel tampone di corsa (TBE 0.5X) lasciandole per 20 minuti in ghiaccio. Il caricamento dei campioni è stato eseguito sciogliendo le gocce di agarosio e caricando la miscela ottenuta fino a riempimento dei pozzetti. Come standard di pesi molecolari è stato usato il DNA di *S. cerevisiae* (Bio-Rad).

La separazione elettroforetica è avvenuta in un gel di agarosio (Seakem LE, BMA) all'1% in TBE 0.5X ed eseguita con l'apparecchio CHEF-DR II (Bio-Rad). I parametri utilizzati sono stati i seguenti: 22 ore di corsa, 6V/cm, angolo di 120°, switch iniziale di 60'' e finale 120'', temperatura di 14°C.

2.15 Ricerca del gene *adeB*

Il sistema di efflusso in *Acinetobacter* è espresso da un operone costituito da tre geni: *adeA*, *adeB*, *adeC*. Essi codificano rispettivamente una proteina di fusione, una proteina della membrana interna e una proteina della membrana esterna. La presenza di tale sistema di efflusso è stata ricercata amplificando un frammento interno di 979pb del gene *adeB*. Sono stati utilizzati i primers (Magnet et al., 2001) O₃ (5'-GTATGAATTGATGCTGC-3') e O₅ (5'-CACTCGTAGCCAATACC-3'). O₃ è complementare alla regione compresa dal nucleotide 6199 al 6213, mentre O₅ dal nucleotide 7177 al 7161, della sequenza AF370885, depositata in GenBank del gene in questione.

La temperatura di annealing utilizzata è stata di 55°C.

3. RISULTATI e DISCUSSIONE

3.1 Raccolta di ceppi ambientali

Batteri appartenenti al genere *Acinetobacter*, come è riportato in tabella 1, sono stati ricercati in campioni ambientali di diversa tipologia.

Con il termine “ambientale” sono stati indicati tutti i campioni di origine non ospedaliera, includendo in questo gruppo anche quelli che provengono da nicchie particolari, come fanghi attivi di depuratori, peli di animali domestici o polvere.

Tabella 1.

Campioni ambientali in cui sono stati ricercati batteri appartenenti al genere *Acinetobacter*

Natura del campione	Campioni esaminati	Campioni positivi
Acqua dolce	6	4
Acqua salmastra	2	1
Acqua mista terra	6	6
Terra	25	18
Polvere	1	1
Fango attivo	4	4
Peli di animali domestici	2	1
Totale	46	35

La ricerca e l'isolamento dei ceppi di *Acinetobacter* sono stati eseguiti secondo le procedure descritte nella sezione Materiali e Metodi. La difficoltà iniziale è stata quella di riconoscere le colonie di *Acinetobacter* su terreno LAM (Leeds *Acinetobacter* Medium). Queste infatti, come descritto in letteratura, si presentano di aspetto rosa pallido, circolari e lisce come quelle di altre specie (Jaward et al., 1994). Con l'esperienza, è stato possibile distinguere le colonie di *Acinetobacter*, che hanno l'aspetto di quella indicata dalla freccia nella figura 3. Tutte le colonie di morfologia adeguata sono state isolate e sulle colture derivate sono stati effettuati i test della catalasi e della citocromo ossidasi per l'identificazione presuntiva del genere. Come mostrato in tabella 1, da 35 campioni su 46 è stato possibile isolare ceppi di *Acinetobacter*. Questi campioni appartengono a tutte le tipologie considerate. Il risultato sottolinea, quindi, l'elevata diffusione del genere in natura. Non è stato possibile, invece, isolare *Acinetobacter* da tamponi cloacali di gabbiano, che casualmente è stato possibile analizzare. L'assenza di *Acinetobacter* in materiale fecale è stata già documentata in precedenza (Grehn et al., 1978).

Solo gli isolati con colonie di morfologia adeguata, risultati catalasi positivi ed ossidasi negativi sono stati sottoposti all'identificazione definitiva del genere mediante:

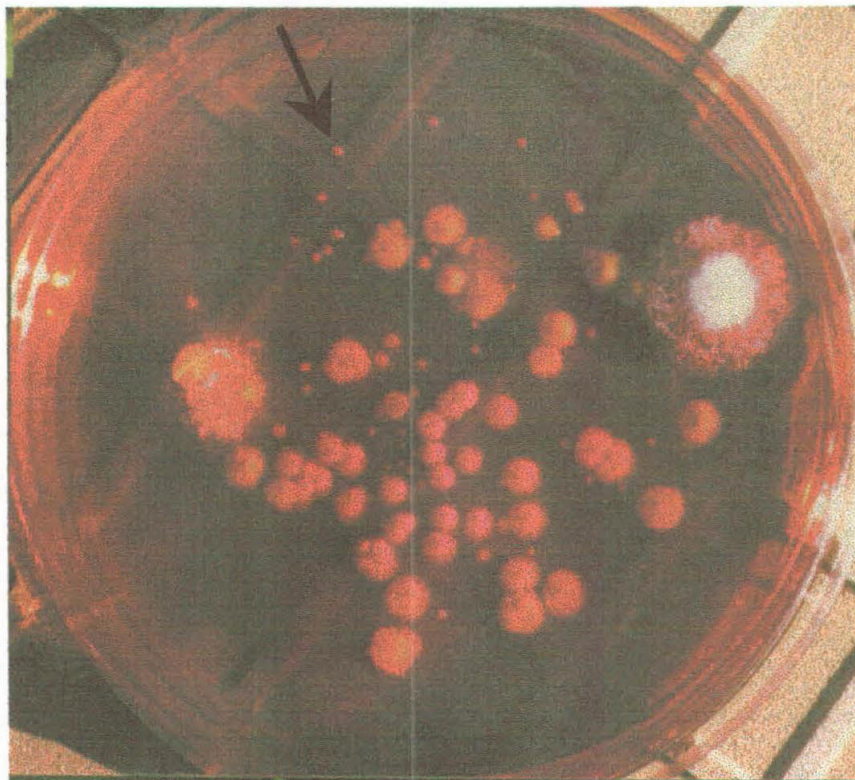
- il test di trasformazione di Juni (Juni, 1972);
- l'utilizzo di una sonda genere specifica (Lagatolla et al., 1998).

3.2 Identificazione del genere

Identificazione mediante test di trasformazione di Juni

Tutti i 58 estratti crudi di DNA dei ceppi esaminati hanno trasformato il ceppo auxotrofo per il triptofano BD413Acinetobacter nelle fasi preliminari. Tuttavia, non è possibile, con i dati in nostro possesso, valutare quantitativamente l'eventuale esclusione di isolati di *Acinetobacter* a causa di un'eccessiva selettività del metodo. E' possibile che alcune genomospecie, che non crescono o crescono con

Figura 3. Morfologia delle colonie su terreno LAM



La coltura è stata incubata per 48 ore a 30°C. La freccia indica una colonia di *Acinetobacter*.

difficoltà sul terreno LAM, siano state escluse (Jaward et al., 1994).

Identificazione mediante ibridazione con la sonda Aci0

La sonda Aci0 è un oligonucleotide di 24 basi complementare ad una sequenza altamente conservata nel genere *Acinetobacter*, compresa tra l'estremità 3' del gene che codifica l'rRNA 16S e l'estremità 5' del gene che codifica il tRNA^{Ile} (Lagatolla et al., 1998). L'analisi è stata effettuata mediante dot-blot. Tutti i 58 isolati identificati come *Acinetobacter* mediante il test di Juni hanno dato un segnale di ibridazione positivo (Figura 4). La sonda Aci0, sviluppata e precedentemente validata su isolati clinici di *Acinetobacter*, è stata usata per la prima volta in questo studio su isolati di specie ambientali. I risultati ottenuti ne dimostrano la validità in questo campo, ampliando la possibilità di impiego della sonda stessa alle specie di *Acinetobacter* che non vengono isolate dall'uomo.

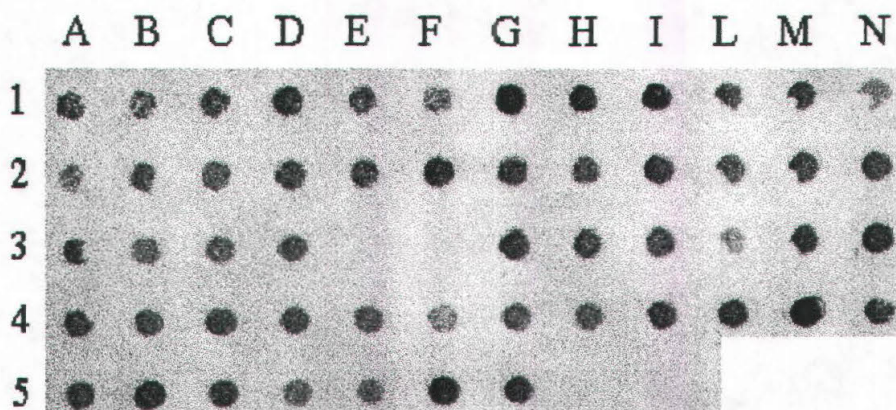
3.3 Identificazione delle genomospecie

Una volta accertata l'appartenenza dei 58 isolati ambientali al genere *Acinetobacter*, il lavoro successivo è stato quello di definire la genomospecie di tutti i ceppi dello studio, includendo in questa fase 63 ceppi clinici di *Acinetobacter* provenienti da diversi ospedali italiani. Questo si è reso necessario in quanto l'identificazione fornita dai laboratori ospedalieri era solo presuntiva e generica.

E' stata effettuata l'analisi di restrizione del gene codificante l'rRNA 16S (Dijkshoorn et al., 1998) e per alcuni isolati anche della regione spacer compresa tra i geni rDNA 16S e 23S (Dolzani et al., 1995). Quest'ultima analisi, ideata per identificare rapidamente le quattro genomospecie (1, 2, 3 e 13TU) appartenenti al complesso *A. calcoaceticus*-*A. baumannii*, è stata applicata per convalidare le identificazioni di alcuni ceppi clinici ed ambientali ottenute con il metodo precedente.

I risultati ottenuti sono riportati in tabella 2.

Figura 4. Esempio di Dot-blot ottenuto ibridando con la sonda Aci0 il DNA genomico degli isolati ambientali presuntivamente identificati come *Acinetobacter*.



	A	B	C	D	E	F	G	H	I	L	M	N
1	1C	2C	6C	7C	8C	9C	10C	11C	16C	17C	18C	gs1
2	19C	20C	21C	22C	23C	24C	25C	26C	27C	28C	29C	gs2
3	30C	31C	32C	33C	N	N	36C	37C	38C	39C	40C	gs3
4	41C	44C	45C	46C	47C	48C	49C	50C	51C	52C	53C	gs12
5	54C	58C	gs4	gs6	gs5	gs7	gs10	N	T			

Come controlli negativi (N) sono stati utilizzati i seguenti ceppi: *E. coli* ATCC 25922 (E3); *E. coli* ATCC 35218 (F3); *P. aeruginosa* ATCC 27853 (H5)

T: tampone

gs: genomospecie

Come controlli positivi sono stati usati i seguenti ceppi di riferimento: ATCC 23055^T(genomospecie 1) (N1); ATCC 19606^T(genomospecie 2) (N2); ATCC 19004 (genomospecie 3) (N3); CIP103788^T(genomospecie 12) (N4); ATCC 17906^T (genomospecie 4) (C5); ATCC 17979 (genomospecie 6) (D5); ATCC 17908^T (genomospecie 5) (E5); ATCC 17909^T (genomospecie 7) (F5); ATCC 17924 (genomospecie 10) (G5).

Tabella 2. Identificazioni genotipiche dei 121 ceppi di *Acinetobacter* in relazione alla loro provenienza

Genomospecie [§]	Isolati di origine clinica	Isolati di origine ambientale	N° totale di isolati
gs1 (<i>A. calcoaceticus</i>)	–	5	5
gs2 (<i>A. baumannii</i>)	40	–	40
gs3	7	2	9
gs4 (<i>A. haemoliticus</i>) o gs13BJ/14TU	4	1	5
gs5 (<i>A. junii</i>)	6	–	6
gs7 (<i>A. johnsonii</i>)	1	2	3
gs8 (<i>A. lwoffii</i>)	1	2	3
gs10	–	6	6
gs11	–	4	4
gs12 (<i>A. radioresistens</i>)	1	–	1
gs13TU	–	1	1
gs13BJ/14TU	–	6	6
gs15TU	–	3	3
Phenom 2 (<i>A. schindleri</i>)	–	3	3
Indeterminati ^A	3	1	4
Non identificati ^B	–	22	22
Totale ceppi	63	58	121

§: i ceppi sono stati identificati mediante ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) tranne alcuni ceppi inclusi nella genomospecie 1 e 3 che sono stati identificati mediante PCR-ribotyping.

gs: genomospecie; TU: genomospecie descritte da Tjernberg e Ursing (1989) BJ: genomospecie descritte da Bouvet e Jeanjean (1989)

^A: isolati che presentano combinazioni ARDRA descritte ma non attribuite a nessuna genomospecie nota.

^B: isolati caratterizzati sia da combinazioni nuove di pattern descritti sia da pattern *RsaI* nuovi

Identificazione dei ceppi di origine clinica

56 dei 63 ceppi clinici analizzati sono stati identificati nell'ambito di 6 diverse genomospecie mentre 7 non sono stati identificati (Tabella 2). Per 4 isolati clinici, infatti, il metodo non permette di distinguere tra le genomospecie 4 e 13BJ/14TU mentre per i rimanenti 3 le combinazioni dei pattern ottenuti, pur essendo già descritte in letteratura (Dijshoorn et al., 1998), non sono state ancora attribuite a nessuna genomospecie. Si tratta dei ceppi 40B, 70B e 106B, riportati in tabella 2 come indeterminati.

Ulteriori informazioni inerenti ai ceppi clinici studiati sono riportate in tabella 3. In particolare, i ceppi clinici di *A. baumannii* di questo studio sono stati isolati da materiale clinico diverso (pus, urine, aspirato bronchiale, sangue e tampone faringeo) da pazienti ricoverati in reparti differenti dei 6 ospedali considerati. La metodica PCR-ribotyping (Dolzani et al, 1995), i cui risultati non vengono riportati, è stata utilizzata per convalidare le identificazioni ARDRA dei 6 ceppi caratterizzati come genomospecie 3.

Tabella 3. Ceppi clinici di *Acinetobacter*

Ceppo	Provenienza	Anno	Materiale clinico	Identificazione §
1B	Trieste	1996	Urine	gs2
2B	Trieste	1996	Urine	gs2
3B	Trieste	1996	Asp.bronch.	gs2
5B	Trieste	1996	ND	gs5
7B	Trieste	1996	Asp.bronch.	gs2
8B	Trieste	1996	Asp. Bronch.	gs2
13B	Trieste	1996	ND	gs3
14B	Trieste	1996	Urine	gs2
16B	Trieste	1996	Tamp.Cutaneo	gs3
19B	Trieste	1996	Urine	gs5
23B	Trieste	1997	Urine	gs2
24B	Trieste	1997	Asp.bronch.	gs2
27B	Trieste	1997	Asp.bronch.	gs2
31B	Trieste	1997	Sangue	gs2
32B	Trieste	1996	Asp. Bronch.	gs2
40B	Trieste	1997	Urine	Indeterminato ^A
53B	Trieste	1997	Tamp.Cutaneo	gs5
70B	Trieste	1997	Urine	Indeterminato ^A
75B	Trieste	1997	ND	gs12
79B	Trieste	1997	Urine	gs5
80B	Trieste	1997	Urine	gs7
100B	Trieste	2000	Urine	gs2

Tabella 3.- Continuazione

101B	Aviano	2000	Urine	gs4 o gs13BJ/14TU
102B	Aviano	2000	Urine	gs5
104B	Aviano	2000	Sangue	gs8
105B	Aviano	1997	Sangue	gs2
106B	Aviano	2000	Sangue	Indeterminato ^A
107B	Udine	2000	Escreato	gs5
108B	Udine	2000	Asp.bronch.	gs2
109B	Udine	2000	Urine	gs2
110B	Udine	2000	Tamp.Faringeo	gs2
111B	Udine	2000	Urine	gs2
5A	Padova	1997	ND	gs4 o gs13BJ/14TU
17A	Padova	1990	Pus	gs2
24A	Trieste	1997	Urine	gs2
38A	Padova	1997	ND	gs4 o gs13BJ/14TU
39A	Padova	1990	Sangue	gs2
56A	Padova	1990	Sangue	gs2
60A	Padova	1990	Pus	gs2
66A	Padova	1997	ND	gs3
68A	Padova	1997	ND	gs4 o gs13BJ/14TU
69A	Padova	1997	ND	gs3
77A	Padova	1997	ND	gs3
83A	Padova	1997	ND	gs3
88A	Padova	1990	Pus	gs2
92A	Padova	1990	Sangue	gs2
94A	Padova	1997	ND	gs3
114A	Padova	1989	Pus	gs2
118A	Padova	1989	Asp.bronch.	gs2
121A	Padova	1989	Sangue	gs2
124A	Padova	1989	Urine	gs2
129A	Padova	1990	Ferita	gs2
132A	Padova	1989	Asp.bronch.	gs2
133A	Padova	1989	Asp.bronch.	gs2
141A	Padova	1989	Urine	gs2
176A	Roma	1993	Pus	gs2
178A	Roma	1993	Urine	gs2
179A	Roma	1993	ND	gs2
200A	Trieste	1995	Urine	gs2
204A	Trieste	1995	Pus	gs2
AT1	Aviano	1996	Urine	gs2
F1	Aviano	1995	Sangue	gs2
AC-54/97	Verona	1997	Asp.bronch.	gs2

§: i ceppi sono stati identificati mediante ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) tranne alcuni ceppi inclusi nella genomspecie 1 e 3 che sono stati identificati mediante PCR-ribotyping.

gs: genomspecie; TU: genomspecie descritte da Tjernberg e Ursing (1989); BJ: genomspecie descritte da Bouvet e Jeanjean (1989).

^A Isolati che presentano combinazioni ARDRA descritte ma non attribuite a nessuna genomspecie nota.

Asp. bronchiale: aspirato bronchiale; Tamp.: tampone; ND: non determinato.

Identificazione dei ceppi di origine ambientale

Il metodo ARDRA, applicato agli *Acinetobacter* ambientali, ha permesso di identificare il 53% dei ceppi analizzati. Le combinazioni numeriche ottenute da 31 dei 58 isolati, infatti, sono risultate presenti nel data-base relativo agli

Acinetobacter descritti in lavori precedenti (Dijkshoorn et al., 1998; Seifert et al., 1997; Nemec et al., 2000) e riconducibili a 10 differenti genomospecie (Tabella 2). Tra queste, la gs10 (n=6), la gs13BJ/14TU (n=6) e la gs11 (n=4) sono state le più frequentemente isolate. Anche in questo caso, come è indicato dalla tabella 2, un ceppo ambientale (60C) ha presentato una combinazione di pattern descritta, ma non riconducibile a nessuna specie nota (Dijkshoorn et al., 1998) e per questo incluso nel gruppo dei ceppi indeterminati, mentre il ceppo 36C, in base ai pattern di restrizione ottenuti con tutti e 7 gli enzimi, è risultato identificabile come genomospecie 4 o genomospecie 13BJ/14TU (Dijkshoorn et al., 1998).

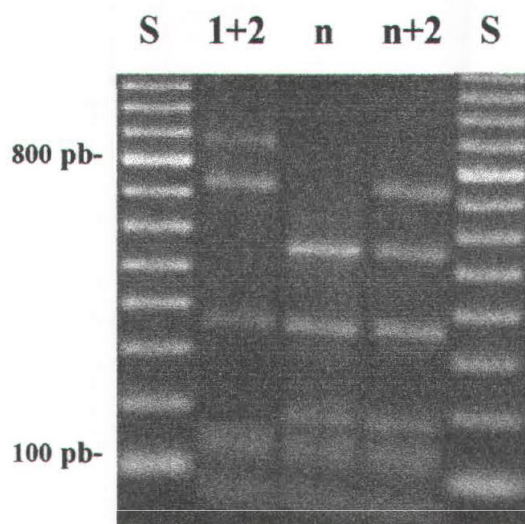
La tipologia del campione da cui sono state isolate le specie ambientali riflette la distribuzione già nota (Towner, 1996), con l'eccezione di quelli identificati come *A. schindleri*, isolati in precedenza solo da materiale clinico. (Dijkshoorn et al., 1998; Nemec et al., 2000). Tra i ceppi ambientali non è stato identificato nessun *A. baumannii*.

I 25 isolati (43%) che non sono stati identificati presentavano combinazioni nuove di pattern di restrizione già esistenti oppure pattern di restrizione mai descritti. Il primo gruppo comprende 13 isolati caratterizzati da 8 nuove e diverse combinazioni. Il secondo gruppo, invece, comprende 12 isolati che hanno dato, dopo digestione con l'enzima *RsaI*, 3 pattern di restrizione mai descritti prima. Essi sono mostrati in figura 5. Il primo di questi è dato dalla sovrapposizione dei profili 1 e 2 già conosciuti (Dijkshoorn et al., 1998) ed è stato definito "1+2". Il secondo è stato provvisoriamente definito "n". Il terzo, invece, risulta dalla sovrapposizione di "n" con il profilo 2 ed è stato perciò definito "n+2". L'aver ottenuto delle sovrapposizioni di profili di restrizione ("1+2" e "n+2") è spiegabile dal fatto che nei procarioti (Anad e Schlessinger, 1990) e nel caso specifico in *Acinetobacter* (Dolzani et al., 1995), sono presenti nel genoma diverse copie del gene rDNA16S, che possono avere sequenze diverse.

Tra i 12 ceppi, 5 presentavano profili *RsaI* "n" associati con pattern di restrizione identici per quanto riguarda le altre quattro endonucleasi (*CfoI*: 1; *AluI*: 4; *MboI*: 1; *MspI*: 3). Tali ceppi, come è discusso più avanti, sono risultati fenotipicamente omogenei.

La tecnica della PCR-ribotyping è stata, invece, applicata a 7 ceppi i cui profili ARDRA corrispondevano (campioni 1C, 2C, 19C e 20C) o erano simili (campioni

Figura 5. Nuovi pattern di restrizione ottenuti con l'enzima *RsaI*



I pattern sono stati ottenuti digerendo 10 μ l di amplificato del gene codificante l'rRNA 16S. I frammenti di restrizione sono stati separati in un gel di agarosio al 2% in TAE 1X. S. 100bp-ladder (Amersham Pharmacia, Biotech, Milano, Italia)
I numeri sopra a ciascuna corsia (1+2, n, n+2) identificano i pattern ottenuti dopo digestione con *RsaI*, descritti per la prima volta in questo lavoro.

10C, 17C e 22C) a quelli di una delle 4 genomospecie facenti parte del complesso *A. calcoaceticus-A. baumannii*.

Per tre isolati (2C, 19C, 20C) sono stati confermati i risultati ottenuti con il metodo ARDRA. Il ceppo 1C non è risultato identificabile con questo metodo. In tre casi l'analisi di restrizione della regione spacer ha permesso l'identificazione di isolati di cui non era stato possibile definire la genomospecie con il metodo ARDRA: si tratta degli isolati 10C e 17C, che davano combinazioni di pattern nuove con il metodo ARDRA e che sono risultati essere *A. calcoaceticus* e del ceppo 22C, che dava un pattern nuovo con l'enzima *RsaI* (1+2) e che è risultato essere *Acinetobacter* genomospecie 3.

Il numero degli isolati identificati completamente è così salito a 34.

Complessivamente, il metodo dell'analisi degli spacer ha quindi consentito di giungere all'identificazione di un numero maggiore di isolati. Considerando che è anche molto più rapido da eseguire, esso dimostra la sua validità.

3.4 Caratterizzazione fenotipica dei ceppi ambientali

I test fenotipici sono stati eseguiti, sia per convalidare le identificazioni genotipiche sia per caratterizzare i ceppi che presentavano combinazioni ARDRA atipiche. Le percentuali di positività ai test, ricavate come descritto in Materiali e Metodi, sono riportate nella tabella 4. Per valutare la validità della scelta dei 15 test e delle percentuali di positività attribuiti a questi ultimi, sono stati analizzati tredici ceppi di riferimento, appartenenti alle genomospecie 1-13TU. Tutti questi sono stati identificati correttamente. Invece, dei 34 ceppi identificati apparentemente in maniera certa con metodi molecolari (ARDRA o PCR-ribotyping), solo il 56% (19 ceppi) hanno avuto un'identificazione fenotipica concordante. E' risultata particolarmente interessante la caratterizzazione dei 5 ceppi con pattern di restrizione *RsaI* definito "n". Questi ceppi sono infatti fenotipicamente molto omogenei, in quanto nessuno è in grado di crescere a temperature di 37, 41 e 44°C e tutti sono negativi ai test dell'emolisi e della gelatinasi, non acidificano in presenza di glucosio e utilizzano triptofano, fenilalanina, azelato, β -alanina, DL-lattato e glutarato come fonte di carbonio. Questi ceppi vengono attribuiti con probabilità molto bassa alle genomospecie

Tabella 4. Matrice delle percentuali di positività ai 15 test utilizzati per la caratterizzazione fenotipica

Test	Genomospecie																				
	1	2	3	4	5	6	7	8/9	10	11	12	13 TU	13BJ/ 14TU	15 TU	14 BJ	15 BJ	16 BJ	17 BJ	Phe1	Phe2	<i>A. venetianus</i>
37°C	90	99	99	98	99	96	1	90	99	1	1	99	50	90	99	99	75	99	99	99	99
41°C	1	99	70	1	76	1	1	1	1	1	1	99	1	50	ND	ND	ND	ND	1	99	1
44°C	1	99	1	1	1	1	1	1	1	1	1	60	1	1	ND	ND	ND	ND	1	1	1
O/F	99	94	99	65	1	78	1	15	99	1	5	99	99	50	99	99	99	99	1	1	1
Emolisi	1	1	1	95	40	98	1	1	1	1	1	1	99	1	99	99	99	99	1	1	99
Gelatinasi	1	1	1	95	1	95	1	1	1	1	1	1	85	1	99	99	99	99	1	1	99
Leucina	38	97	94	90	18	90	5	1	1	1	99	98	10	1	99	99	99	99	1	1	ND
Triptofano	91	91	91	1	1	1	1	1	1	1	14	91	67	1	99	50	50	99	ND	ND	ND
Fenilalanina	99	85	65	1	1	1	1	1	1	1	95	90	99	1	99	99	99	99	1	1	ND
Azelato	99	95	95	2	7	1	25	90	70	80	95	93	20	90	99	1	99	1	99	64	ND
β-alanina	95	95	95	2	1	2	1	1	99	99	1	93	30	1	99	30	60	99	1	1	ND
DL-lattato	99	99	99	1	99	1	99	99	99	99	99	93	99	50	ND	ND	ND	ND	99	99	1
Citrato	99	99	99	76	65	90	70	12	99	80	1	99	99	10	99	1	99	99	99	59	99
Glutarato	90	99	85	10	10	10	15	20	99	99	95	93	25	20	99	1	99	99	97	95	ND
Malonato	99	98	90	1	1	1	15	1	1	10	95	93	50	1	99	1	50	50	1	1	99

Sono riportate le percentuali di ceppi delle singole genomospecie che danno reazione positiva al test. ND: non esistono dati pubblicati

TU: genomospecie descritte da Tjernberg e Ursing (1989); BJ: genomospecie descritte da Bouvet e Jeanjean (1989).

Phe1 (phenom 1) e Phe2 (phenom 2) corrispondenti alla genomospecie denominata rispettivamente *A. ursingii* e *A. schindleri*.

Test O/F: test di acidificazione in presenza di glucosio utilizzando il terreno Bacto OF Basal Medium-Dehydrated (Difco) preparato come indicato dalla ditta produttrice, con l'aggiunta di D-glucosio all'1%.

inserite nella matrice, abbiamo quindi ipotizzato che possano appartenere ad una specie non ancora descritta.

Complessivamente, i risultati delle identificazioni sono stati piuttosto insoddisfacenti. Questo riguarda soprattutto i ceppi ambientali, che sono rimasti non identificati in poco meno della metà dei casi.

Sembra, in effetti, che gli schemi di identificazione disponibili risultino inadeguati per il riconoscimento di questi ultimi, in quanto non riflettono la variabilità fenotipica e genotipica esistente. Tali metodi di identificazione dovrebbero, conseguentemente, essere rivisti. Infatti, sono stati inizialmente ideati e convalidati su un numero insufficiente di ceppi, in larga maggioranza di origine clinica. Per tale motivo è consigliata, da molti autori, una combinazione di più metodi per compensare le reciproche limitazioni. Tuttavia, nel caso in cui i ceppi non vengano riconosciuti con metodi genotipici nè fenotipici, è lecito ipotizzare l'esistenza di specie nuove. Carr (Carr et al., 2001), esaminando mediante RAPD la variabilità di ceppi di *Acinetobacter* isolati da fanghi attivi, ha verificato una diversità molto più ampia di quella riscontrabile analizzando ceppi appartenenti a genospecie note. La stessa osservazione è stata fatta anche da Barberio (Barberio et al., 1998), utilizzando l'analisi di restrizione degli rDNA 16S amplificati anche in questo caso da campioni di fango attivo, senza coltura. L'intera tassonomia del genere andrebbe, dunque, rivista, per accomodare anche i ceppi di derivazione ambientale.

Per verificare l'identità dei ceppi con pattern "n", è stato clonato e sequenziato il gene codificante l'rRNA 16S di uno di questi, ovvero il 28C.

3.5 Sequenziamento del gene codificante l'rRNA 16S del ceppo 28C

Il sequenziamento del gene è stato completato per le prime 600 paia di basi. La ricerca mediante BLAST ha dimostrato che la sequenza appartiene ad *Acinetobacter*, in quanto le prime 50 sequenze omologhe trovate risultano appartenere a membri di questo genere, con l'eccezione di alcuni batteri non identificati. Tuttavia, la sequenza con maggiore somiglianza, appartenente ad un *Acinetobacter anitratus* (accesso n. U10874) non ulteriormente caratterizzato,

presenta solo il 93% di omologia (536/574 identità, 4 gaps), inferiore a quella riscontrabile nell'ambito di una stessa specie (Magee, 1998). I risultati ottenuti con il sequenziamento, per quanto ancora da approfondire, confermerebbero, quindi, che potrebbe trattarsi di una specie non ancora descritta.

3.6 Antibiotico-resistenza

E' stata valutata, mediante il test di diffusione in agar (Test di Kirby-Bauer), la suscettibilità a 16 antibiotici di classi diverse e i risultati ottenuti sono stati espressi in termini di sensibilità o di resistenza sulla base delle tabelle di riferimento (NCCLS, 2001) del National Committee for Clinical Laboratory Standards, USA.

I pattern di resistenza osservati in relazione alle diverse genomospecie sono riportati in tabella 5. Come si può osservare gli isolati resistenti agli antibiotici non sono uniformemente distribuiti tra le diverse genomospecie.

Le genomospecie che più frequentemente veicolano antibiotico-resistenze sono quelle di preminente isolamento clinico (vedi tabella 2), come la genomospecie 2 e la 3 (Seifert et al., 1993). Significative, tuttavia, sono anche le resistenze, in particolare quelle verso i β -lattamici, riscontrate negli isolati della genomospecie 1, di origine esclusivamente ambientale. Le altre specie, alcune delle quali rappresentate da pochi ceppi sono suscettibili alla maggior parte degli antibiotici. Tra queste la genomospecie 5 e la 8 sono ritenute le più suscettibili tra le specie di isolamento clinico (Seifert et al., 1993; Vila et al., 2002), dato confermato, almeno per quanto riguarda la genomospecie 5, anche dai nostri risultati.

Indipendentemente dall'origine degli isolati, sono risultate molto diffuse le resistenze al cloramfenicolo (52%), all'aztreonam (54%) e all'ampicillina (55%) (Tabella 5). Questi valori sono concordi con quanto trovato da altri autori valutando il livello di antibiotico-resistenza sia in ceppi clinici (Seifert et al, 1993; Bergogne-Bérézin, 1996) che in ceppi di derivazione ambientale apparentemente non sottoposti a pressione selettiva. (Guardabassi et al., 1999; Carr et al., 2001). Molti *Acinetobacter* risultano quindi intrinsecamente resistenti a questi antibiotici. E' nota, infatti, per quanto riguarda la resistenza nei confronti dei β -lattamici, la presenza sia di cefalosporinasi costitutive a localizzazione cromosomica, che di

Tabella 5. Distribuzione di antibiotico-resistenze tra le diverse genomospecie

Genomospecie§	AMK	TOB	GEN	AMP	CRO	CTX	CAZ	FEP	PIP	ATM	SAM	TZP	IMP	SXT	CIP	CHL	N° totale ceppi
gs1 (<i>A. calcoaceticus</i>)	0	0	0	5	0	0	0	0	4	5	0	0	0	0	0	4	5
gs2 (<i>A. baumannii</i>)	15	12	20	37	27	26	21	4	24	31	0	8	1	25	17	40	40
gs3	0	1	1	9	2	1	1	0	6	5	0	0	0	1	0	9	9
gs4 (<i>A. haemoliticus</i>) o gs13BJ/14TU	0	4	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	3	5
gs5 (<i>A. junii</i>)	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	6
gs7 (<i>A. johnsonii</i>)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
gs8 (<i>A. lwoffii</i>)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
gs10	0	0	0	6	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	2	6
gs11	0	0	0	4	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	4
gs12 (<i>A. radioresistens</i>)	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
gs13TU	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
gs13BJ/14TU	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	3	6
gs15TU	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
Phenom 2 (<i>A. schindleri</i>)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
Indeterminati ^A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	4
Non identificati ^B	0	0	0	4	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	22
Resistenze totali	15	18	22	67	29	27	22	4	34	65	0	8	1	30	18	63	121

E' indicato il numero di ceppi resistenti nei confronti dei seguenti antibiotici: Amikacina (AMK); Tobramicina (TOB); Netilmicina (NET); Gentamicina (GEN); Ceftriaxone (CRO); Cefotaxime (CTX); Ceftazidime (CAZ); Cefepime (FEP); Piperacillina (PIP); Piperacillina-Tazobactam (TZP); Aztreonam (ATM); Imipenem (IMP); Trimethoprim-Sulfametossazolo (SXT); Ciprofloxacina (CIP); Cloramfenicolo (CHL); Ampicillina (AMP). La valutazione dell'antibiotico resistenza è stata eseguita mediante il metodo della diffusione in agar seguendo le direttive dell'NCCLS e utilizzando le sue tabelle di riferimento per l'interpretazione dei dati.

§: i ceppi sono stati identificati mediante ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) tranne alcuni ceppi inclusi nella genomospecie 1 e 3 che sono stati identificati mediante PCR-ribotyping.

TU: genomospecie (gs) descritte da Tjernberg e Ursing (1989); BJ: genomospecie descritte da Bouvet e Jeanjean (1989).

^A Isolati che presentano combinazioni ARDRA descritte ma non attribuite a nessuna genomospecie nota.

^B Isolati caratterizzati sia da combinazioni nuove di pattern descritti sia da pattern *RsaI* nuovi.

altre β -lattamasi plasmidiche (Bergogne-Bérézin, 1996; Amyes e Young, 1996; Da Silva et al., 1999; Perilli et al., 1996).

Notevoli, come detto precedentemente, sono le percentuali di resistenza riscontrate nei 40 ceppi identificati come *A. baumannii* (genomospecie 2). Essi sono risultati molto spesso portatori di resistenze multiple nei confronti di tutte le categorie di antibiotici, con pattern di resistenza piuttosto variabili da ceppo a ceppo (per maggiori dettagli vedi tabella 8A e 8B). Gli isolati di questo studio sono relativamente suscettibili agli aminoglicosidici (amikacina e tobramicina), alle cefalosporine di ultima generazione (cefepime), all'imipenem (carbapenem) ed ai β -lattamici associati con gli inibitori di β -lattamasi. Sono state riscontrate infatti, resistenze verso tutti gli antibiotici saggiati, tranne che verso l'associazione ampicillina-sulbactam (SAM). Questa associazione è stata segnalata da altri autori come una delle più efficaci nel trattamento delle infezioni da *Acinetobacter baumannii* multiresistenti. Il sulbactam, oltre a fungere da inibitore delle β -lattamasi, ha infatti un'attività intrinseca su questi microrganismi (Pandey et al., 1998; Kuah et al., 1994; Vila et al., 1993).

3.7 Ricerca gene dell'integrasi di tipo 1

Per dare un contributo al chiarimento dei meccanismi di trasferimento dei geni R in *Acinetobacter*, è stata valutata la diffusione di integroni nei ceppi dello studio.

La ricerca del gene per l'integrasi di tipo 1, condotta su *Acinetobacter baumannii* mediante tecnica del dot-blot, utilizzando una sonda complementare ad una regione di 249pb interna al gene *intI1*, ha evidenziato la positività di 20 su 40 ceppi totali (50%) (Tabella 6).

Questo è il primo studio in cui è stata determinata la reale frequenza del gene *intI1* in *Acinetobacter baumannii*. Finora, infatti, la maggior parte degli studi ha ricercato tali elementi genetici soprattutto in ceppi clinici multiresistenti, (Ploy et al., 2000; Seward e Towner, 1999; Gallego e Towner, 2001; Ramirez et al., 2000; Riccio et al., 2000; Seward et al., 1998; Vila et al., 1997; Koeleman et al., 2001; Chu et al., 2001, Oh et al., 2002; Yum et al., 2002), rilevando di conseguenza frequenze più elevate. Il primo di questi (Seward et Towner, 1999) ha trovato tali elementi genetici in 17/25 (68%) ceppi provenienti da differenti paesi del mondo,

Tabella 6. Presenza del gene *intI1* nel genere *Acinetobacter*

	N° isolati positivi	N° isolati totali
<i>A. baumannii</i>	20	40
<i>A. clinici non baumannii*</i>	0	23
<i>Acinetobacter</i> ambientali*	0	58
TOTALE	20	121

*per il dettaglio delle genomospecie, vedi tabella 2.

il secondo (Ploy et al., 2000) ha trovato il gene *intI1* in 16/20 (80%) ceppi, soprattutto isolati in Francia, mentre l'ultimo in ordine di tempo (Oh et al., 2002) ha riscontrato tale gene in 63/77 ceppi clinici di *Acinetobacter* (69 *A. baumannii* e 8 *Acinetobacter* genomospecie 13TU) provenienti da ospedali coreani.

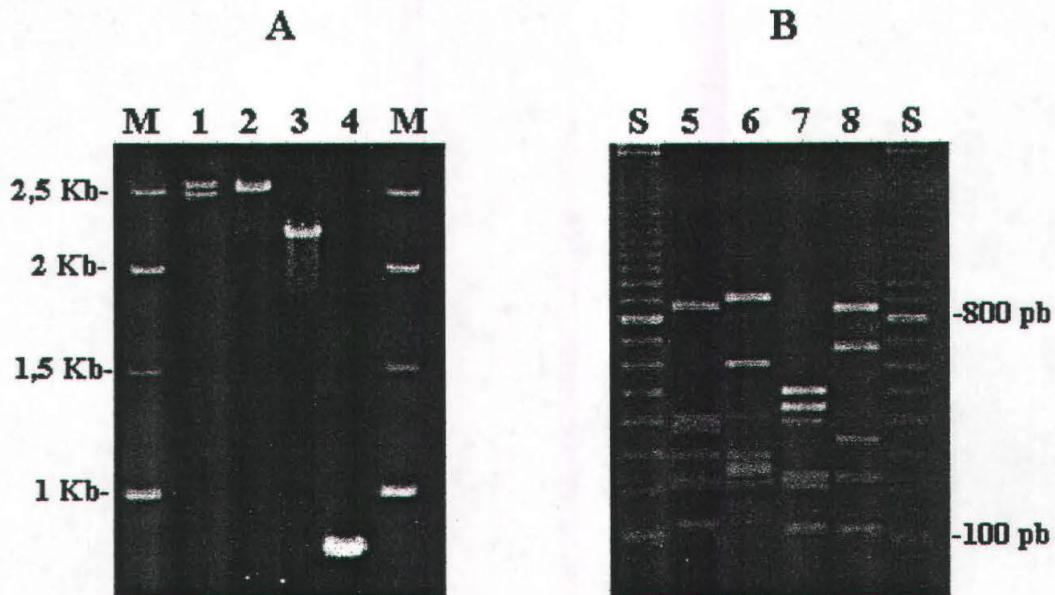
La ricerca del gene *intI1* è stata estesa anche agli altri *Acinetobacter* dello studio, sia di origine clinica che ambientale, in quanto si è voluto verificare se, come è stato proposto da Petersen (Petersen et al., 2000), essi potessero fungere eventualmente da serbatoi di integroni e di geni R. La ricerca ha dato in tutti i casi esito negativo (Tabella 6). Risulta evidente, quindi, che la specie che è più frequentemente portatrice di integroni è *A. baumannii*, che mantiene questo primato anche quando è confrontata con altri ceppi clinici, di specie diverse. I ceppi ambientali esaminati costituiscono probabilmente un campione troppo esiguo per avere un'indicazione della reale frequenza della presenza di integroni. Questi sono stati descritti in un unico lavoro associati a ceppi isolati da materiale non clinico, in particolare alla genomospecie 5 e ad un altro ceppo non identificato (Petersen et al., 2000). Tuttavia, è da sottolineare che lo studio di Petersen ha trovato integroni in ceppi isolati da colture di pesci d'acqua dolce sottoposte a trattamento antibiotico. Lo stesso autore, in effetti, non può affermare se ci sia stata selezione di ceppi autoctoni, oppure se i ceppi siano stati introdotti con il cibo fornito ai pesci.

Allo stato attuale della conoscenza, appare quindi difficile ritenere che le specie ambientali possano fungere da serbatoio di integroni di tipo 1, anche se non può essere esclusa la presenza di altre tipologie di integroni strutturalmente diversi da quelli identificati nei ceppi ospedalieri.

3.8 Amplificazione della regione variabile degli integroni di tipo 1

Gli integroni di 20 ceppi di *Acinetobacter baumannii* risultati positivi alla ricerca dell'integrasi di tipo 1 sono stati ulteriormente caratterizzati. La successiva amplificazione delle loro regioni variabili, con i primers 5'CS e 3'CS, complementari alle sequenze conservate alle estremità degli integroni di tipo 1 (Figura 1), ha dato origine a frammenti di 4 lunghezze diverse, rispettivamente di 0.8 Kb, 2.2 Kb, 2.4 Kb e 2.5 Kb (Figura 6-A).

Figura 6. Prodotti di amplificazione della regione variabile degli integroni di tipo 1 (A) e risultati della loro analisi di restrizione (B)



Nella figura 6A sono indicati i diversi amplificati della regione variabile dell'integrone di tipo 1 ottenuti con i primers 5'CS e 3'CS.

Corsia 1: isolato AC-54/97 (amplificati di 2.5 e 2.4 Kb)

Corsia 2: isolato 7B (amplificato di 2.5 Kb)

Corsia 3: isolato 200A (amplificato di 2.2 Kb)

Corsia 4: isolato 204A (amplificato di 0.8 Kb)

M: Kilobase pair ladder (Amersham Pharmacia Biotech, Milano, Italia)

Nella figura 6B sono mostrati pattern rappresentativi ottenuti con gli enzimi *AluI* (corsia 5 e 7) o *MspI* (corsia 6 e 8) degli amplificati di 2.5 Kb (isolato 7B, corsia 5 e 6) o di 2.2 Kb (isolato 200A, corsia 7 e 8).

I frammenti di restrizione sono stati separati in un gel di agarosio al 2% in TAE 1X.

S:100bp-ladder (Amersham Pharmacia, Biotech, Milano, Italia)

Il ceppo AC-54/97 presenta due integroni, uno di 2.5 Kb ed uno di 2.4 Kb (In42) precedentemente caratterizzato (Riccio et al, 2000).

Delle 4 classi di amplificati, quella di 2.5 Kb è risultata essere la più diffusa, presente in ben 17/20 ceppi integrasi-positivi, mentre quelle da 0.8 Kb e 2.2 Kb sono stati riscontrati rispettivamente in 1 e 2 ceppi.

Per controllare la specificità degli amplificati, è stata ripetuta l'amplificazione sul DNA estratto dai medesimi ceppi, utilizzando la coppia dei primers 5'CS e Sull. Quest'ultimo oligonucleotide è complementare ad una regione del gene che codifica la resistenza alle sulfonamidi (*sulI*) situato nella regione conservata 3'CS (Figura 1). Quando tale regione è integra, la grandezza degli amplificati risulta incrementata di 1000bp, pari alla distanza tra le posizioni dei primers 3'CS e Sull, rispetto all'amplificazione precedente. I risultati ottenuti sono stati quelli attesi per tutti i campioni, confermando così anche la struttura caratteristica degli integroni di tipo 1.

3.9 Analisi dell'integrone di tipo 1

Dato che uguale lunghezza degli amplificati delle regioni variabili non implica integroni uguali, in quanto tali elementi possono differire per il numero, per l'ordine e anche per la tipologia delle cassette costituenti la regione variabile, gli amplificati di uguale lunghezza (2.2 Kb e 2.5 Kb) sono stati sottoposti ad analisi di restrizione. Sono state utilizzate due endonucleasi (*AluI* e *MspI*), che tagliano frequentemente il DNA, riconoscendo siti di sole 4 pb.

Gli amplificati di uguali dimensioni hanno dato identici pattern di restrizione con entrambi gli enzimi ed inoltre la somma dei frammenti di restrizione è risultata uguale alle dimensioni dell'amplificato non digerito. Esempi dei pattern ottenuti sono riportati in figura 6-B.

Di conseguenza, è stato ipotizzato che le regioni variabili degli integroni dei ceppi in questione fossero identiche o molto simili.

3.10 Sequenza della regione variabile degli integroni di tipo 1

Sequenza della regione variabile di 2.5 Kb

L'analisi della sequenza dell'amplificato di 2.5 Kb del ceppo AC-54/97, effettuata utilizzando il programma BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), ha rilevato la presenza di 4 cassette geniche (Figura 7-B). La prima cassetta contiene il determinante *aacC1*, che codifica una aminoglicoside acetiltransferasi, AAC(3)-Ia che conferisce resistenza alla gentamicina. La seconda e la terza contengono ognuna una orf (open reading frame) a funzione sconosciuta, indicate rispettivamente come orfx e orfx', le cui sequenze risultano essere parzialmente sovrapposte. mentre la quarta cassetta, veicola il determinante genico *aadA1a*, codificante una aminoglicoside adeniltransferasi AAD(3'')-Ia, che conferisce resistenza alla streptomomicina.

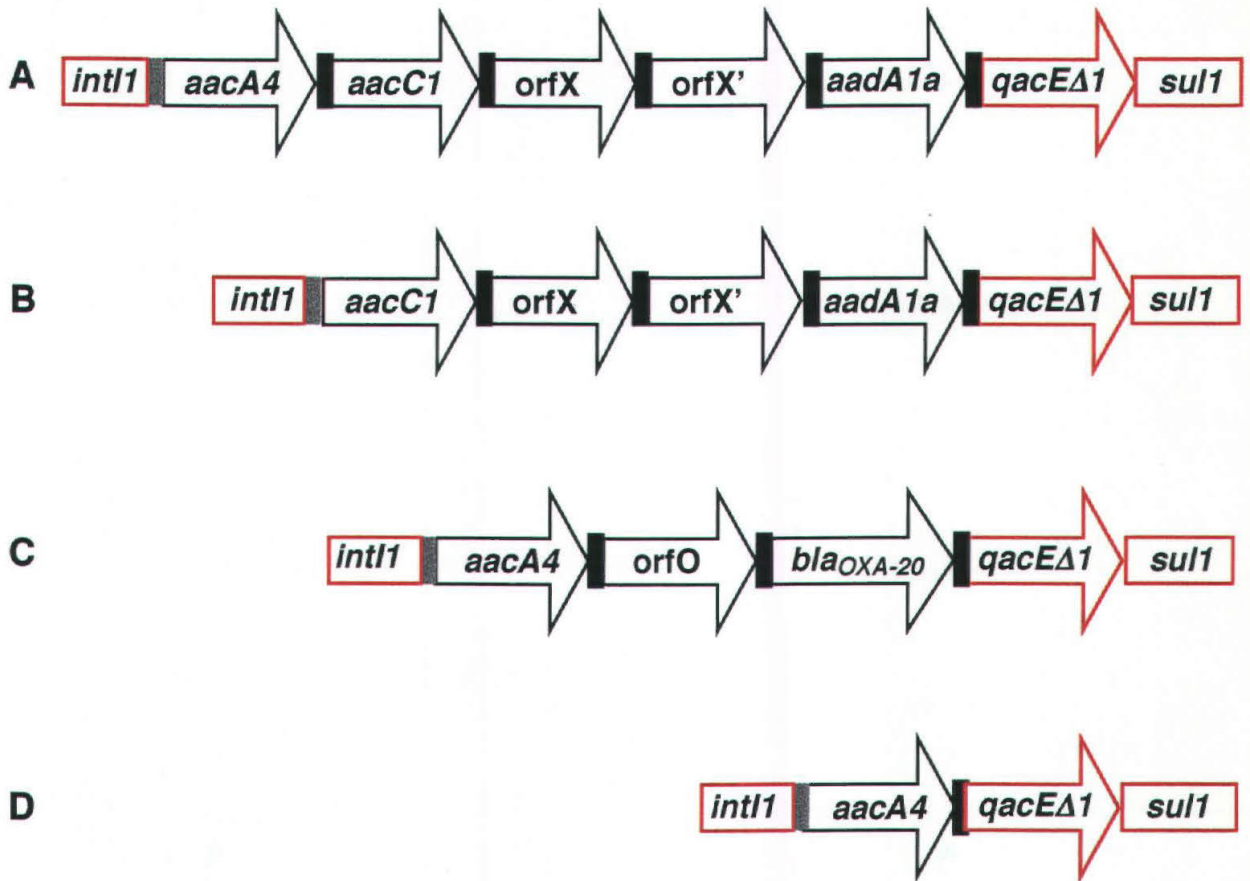
Identici risultati sono stati ottenuti dal sequenziamento, eseguito dalla dott.ssa D. Pirulli, presso il Dipartimento di Genetica Molecolare dell'Università di Trieste dell'amplificato di 2.5 Kb ottenuto dal campione 7B.

La ricerca in banca dati, inoltre, ha evidenziato un'omologia di sequenza molto elevata (99%) con parte di un inserto di un integrone di tipo 1, a localizzazione plasmidica, descritto in *Klebsiella oxytoca* (Preston et al., 1999), *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium (Tosini et al., 1998; Villa et al., 2000) e *Klebsiella pneumoniae* (n° AF282595, EMBL/GenBank). Tuttavia nei tre casi riportati, la parte variabile dell'integrone è caratterizzata da una ulteriore cassetta in cui è presente il determinante *aacA4* (Figura 7-A). Tale cassetta è la prima in posizione 5', quindi l'ultima ad essere stata acquisita.

Sequenza della regione variabile di 2.2 Kb

Il sequenziamento dell'inserto di 2.2 Kb del ceppo 200A ha permesso di identificare la presenza di tre cassette (Figura 7-C). La prima, *aacC4*, codificante per una aminoglicoside acetiltrasferasi AAC(6')-Ib (Shaw et al., 1993), che conferisce resistenza a tre diversi aminoglicosidi (amikacina, netilmicina e tobramicina), è seguita da una seconda contenente orfO. Anche in questo caso si

Figura 7. Struttura degli integroni di tipo 1 trovati nei ceppi di *Acinetobacter baumannii* (B, C, D) comparata con quella di un integrone di tipo 1 trovato in *Enterobacteriaceae* (A)



Le sequenze codificanti sono indicate dalle frecce a cui è stato attribuito il nome corrispondente. I siti *attC* e *attI* sono indicati rispettivamente da rettangoli di colore nero e grigio.

A: struttura dell'integrone di tipo 1 a localizzazione plasmidica (Incl/M), trovato in *K. oxytoca* e *S. enterica* serotipo Thyphimurium.

B-C-D: struttura degli integroni di tipo 1 con inserti rispettivamente di 2.5 Kb, 2.2 Kb e 0.8 Kb trovati nei ceppi clinici di *A. baumannii* di questo lavoro.

tratta di una Orf a funzione ancora sconosciuta, la cui presenza è stata tuttavia già documentata in altri integroni (Ploy et al., 2000). La terza cassetta, infine, contiene il gene *bla_{oxa-20}* (Naas et al., 1998). Esso codifica per una β -lattamasi che conferisce resistenza all'oxacillina. Questa stessa disposizione di cassette è già stata descritta in integroni di tipo 1 di due ceppi di *A. baumannii*, di provenienza rispettivamente francese (Ploy et al., 2000) e spagnola (n°AY007784, EMBL/GenBank). In quest'ultimo caso, tuttavia, il gene *bla_{oxa}* presenta alcune differenze nella sequenza nucleotidica ed è stato denominato *bla_{oxa-31}*.

Sequenza della regione variabile di 0.8 Kb

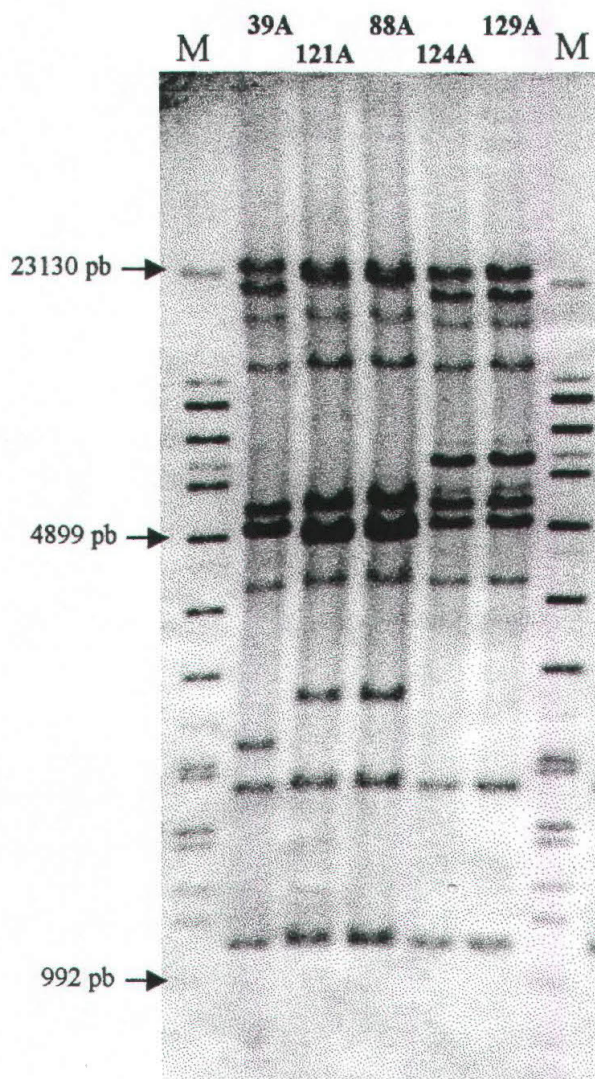
Per quanto riguarda l'integrone con inserto di 0.8 Kb, identificato solo nel ceppo 204A, esso veicola un'unica cassetta *aacC4* (Figura 7-D), la stessa identificata nella regione variabile dell'integrone di 2.2 Kb dei ceppi 200A e 23B. Questo integrone è risultato essere uno tra i più diffusi tra le *Enterobacteriaceae* (Martinez-Freijo et al., 1999).

3.11 Ribotipizzazione

Data la sorprendente frequenza di una stessa tipologia di integrone con un inserto di 2.5 Kb, per verificare se si tratta di uno stesso ceppo epidemico diffusi negli ospedali oppure di ceppi con caratteristiche diverse con lo stesso elemento genico, tutti i 40 ceppi di *A.baumannii* sono stati tipizzati mediante la tecnica della ribotipizzazione (Gerner-Smidt, 1992).

La ribotipizzazione è il metodo di tipizzazione utilizzato per *A. baumannii* dai laboratori di riferimento (Dijkshoorn et al., 1996). E' un metodo altamente discriminante, soprattutto se vengono considerati complessivamente i risultati ottenuti con tre diverse endonucleasi, nella fattispecie *EcoRI*, *SalI* e *ClaI*. L'indice di discriminazione complessivo pubblicato è di 0.97 (Gerner-Smidt, 1992), secondo solamente a quello ottenibile con l'analisi di macrorestrizione ($D=0.98$) (Seifert e Gerner-Smidt, 1995). Un esempio di ribotipizzazione è riportato in figura 8. I risultati ottenuti sono riportati in tabella 7. I numeri arabi indicano i diversi ribotipi ottenuti con i tre enzimi di restrizione *SalI*, *EcoRI*, e *ClaI*. Come descritto in Materiali e Metodi, ai ceppi è stato attribuito, per ciascun enzima, lo stesso ribotipo quando il coefficiente di somiglianza (Dice) era uguale o superiore

Figura 8. Esempio di ribotipizzazione



In questa membrana sono riportati esempi di ribotipi ottenuti digerendo il DNA genomico con *EcoRI*. I frammenti di restrizione ottenuti, separati in un gel di agarosio all'0,8% in TAE 1X, sono stati trasferiti per capillarità su membrana di Nylon ed ibridati con la sonda costituita da una miscela di cDNA complementari agli rRNA 16 e 23S.

M: Standard di riferimento (23130, 9416, 8576, 7427, 6557, 6106, 4899, 4361, 3639, 2799, 2322, 2027, 1953, 1882, 1515, 1482, 1164, 992 pb) è costituito da una miscela di Molecular Weight Marker II e Molecular Weight Marker VII (Roche Diagnostic, Milano, Italia) nelle proporzioni di 1:1.

Tabella 7. Risultati della ribotipizzazione dei 40 ceppi di *A. baumannii*

Gruppo ribotipico	Ribotipi			N° ceppi
	<i>SaII</i>	<i>EcoRI</i>	<i>Clal</i>	
I	1	1	7	2
II	1	1	10	1
III	2	1	8	1
IV	3	7	5	4
V	3	1	3	1
VI	3	8	5	2
VII	3	6	5	4
VIII	3	12	9	1
IX	3	1	12	1
X	3	3	3	1
XI	4	10	11	1
XII	5	2	10	1
XIII	6	9	10	1
XIV	7	4	13	1
XV	8	5	4	1
XVI	9	3	4	2
XVII	9	3	1	1
XVIII	9	2	4	1
XIX	10	6	2	1
XX	11	2	4	1
XXI	12	1	3	1
XXII	13	11	9	1
XXIII	14	2	4	3
XXIV	15	2	6	1
XXV	16	2	4	2
XXVI	17	2	4	1
XXVII	18	2	4	1
XXVIII	19	2	4	1

I numeri romani identificano le combinazioni dei differenti ribotipi (numeri arabi) ottenuti con ciascuno dei tre enzimi utilizzati (*EcoRI*, *SaII*, *Clal*).

a 0.85. Dai dati emerge che *SaII* è stato l'enzima più discriminante, permettendo di distinguere 19 ribotipi mentre gli enzimi *EcoRI*, e *ClaI*, hanno suddiviso gli isolati rispettivamente in 12 e 13 distinti ribotipi.

Combinando i risultati ottenuti con le tre endonucleasi, i 40 ceppi sono stati suddivisi in 28 gruppi finali. Ogni gruppo, indicato da un numero romano, identifica quindi una specifica combinazione di ribotipi. 21 gruppi includono un unico isolato, mentre gli altri 7 comprendono da 2 a 4 isolati ciascuno. Come esplicitato dalle tabelle 8A-8B i ceppi con un'identica combinazione sono stati generalmente isolati dallo stesso ospedale, lasciando presupporre, in alcuni casi (gruppo IV e VII) l'espansione clonale di un unico ceppo. Questo risultato era atteso nel caso del gruppo IV, in quanto i 4 isolati appartengono ad un cluster epidemico. I risultati ottenuti dall'analisi di tipizzazione rivelano, complessivamente, una notevole diversità genetica degli isolati clinici analizzati.

3.12 Presenza di integroni identici in ceppi genotipicamente distinguibili

In base ai dati della ribotipizzazione, integroni di tipo 1 sono presenti in 10 dei 28 gruppi ottenuti (Tabella 8B). In particolare, l'integrone con l'inserito di 2.5 Kb è presente in 17 ceppi (provenienti da 5 dei 6 ospedali considerati, raccolti nel periodo 1989-2000, ed isolati da materiale clinico diverso) che sono risultati appartenere a 8 di questi 10 gruppi genotipici. Tali dati escludono quindi l'ipotesi dell'espansione clonale di un unico ceppo. Essi, al contrario, suggeriscono che l'integrone con l'inserito di 2.5 Kb sia una struttura piuttosto stabile, trasmessa orizzontalmente tra ceppi clinici genotipicamente distinguibili di *A. baumannii*. E' inoltre ipotizzabile che si sia verificato uno scambio di materiale genetico con *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium o *Klebsiella oxytoca* e *Klebsiella pneumoniae*. Per quanto riguarda i rimanenti due tipi di integrone trovati, il gruppo XXV comprende due ceppi triestini (23B e 200A) isolati a due anni di distanza (1995 e 1997) ed aventi l'integrone con un inserito di 2.2 Kb mentre il gruppo XII comprende il solo ceppo 204A, che presenta l'integrone con una regione variabile di 0.8 Kb.

Tabella 8A. Caratterizzazione degli isolati di *Acinetobacter baumannii* integroni negativi

Gruppo ribotipico	Isolato	Ospedale ^a ed anno di isolamento	Materiale clinico	Antibiogramma ^b
I	88A	P, 1990	Pus	AMK TOB NET GEN CRO CTX CAZ FEP PIP TZP ATM SXT CHL AMP
	121A	P, 1989	Sangue	TOB GEN CRO CTX CAZ PIP TZP ATM SXT CIP CHL AMP
II	92A	P, 1990	Sangue	TOB GEN CRO CTX CAZ PIP TZP ATM SXT CHL AMP
III	27B	T, 1997	Asp. bronchiale	CHL
V	3B	T, 1996	Asp. bronchiale	ATM CHL AMP
VIII	105B	A, 1997	Sangue	CRO CTX CHL AMP
IX	56A	P, 1990	Sangue	CHL AMP
X	39A	P, 1990	Sangue	CHL
XI	178A	R, 1993	Urine	CHL AMP
XIII	176A	R, 1993	Pus	AMK CRO CTX CAZ PIP TZP ATM CIP CHL AMP
XIV	31B	T, 1997	Sangue	CHL
XV	118A	P, 1989	Asp. bronchiale	CHL AMP
XVI	124A	P, 1989	Urine	ATM CHL AMP
	129A	P, 1990	Ferita	ATM CHL AMP
XVII	17A	P, 1990	Pus	ATM CHL AMP
XVIII	AT1	A, 1996	Urine	ATM SXT CHL AMP
XX	F1	A, 1995	Sangue	CRO SXT CHL AMP
XXI	132A	P, 1989	Asp. bronchiale	CHL AMP
XXII	110B	U, 2000	Tampone faringeo	CRO CTX ATM CHL AMP
XXVI	141A	P, 1989	Urine	CRO CTX PIP ATM SXT CHL AMP

Tabella 8B. Caratterizzazione degli isolati di *Acinetobacter baumannii* integroni positivi

Gruppo ribotipico	Isolato	Ospedale ^a ed anno di isolamento	Materiale clinico	Dimensioni amplificato ^c (5'CS/3'CS)	Bande di ibridazione ^d	Antibiogramma ^b
IV	7B	T, 1996	Asp. bronchiale	2,5	23	AMK NET GEN CRO CTX CAZ PIP ATM SXT CIP CHL AMP
	8B	T, 1996	Asp. bronchiale	2,5	23	AMK NET GEN CRO CTX CAZ PIP ATM SXT CIP CHL AMP
	14B	T, 1996	Urine	2,5	23	GEN CRO CTX CAZ PIP ATM SXT CHL AMP
	32B	T, 1996	Asp. bronchiale	2,5	23	AMK NET GEN CRO CTX CAZ PIP TZP ATM SXT CIP CHL AMP
VI	2B*	T, 1996	Urine	2,5	23	AMK TOB NET GEN CRO CTX CAZ FEP PIP ATM SXT CIP CHL AMP
	24B*	T, 1997	Asp. bronchiale	2,5	23	AMK GEN CRO CTX CAZ FEP PIP ATM SXT CIP CHL AMP
VII	100B*	T, 2000	Urine	2,5	18	AMK GEN CRO CTX CAZ PIP ATM SXT CIP CHL AMP
	108B	U, 2000	Asp. bronchiale	2,5	18	AMK GEN CRO CTX CAZ PIP ATM SXT CIP CHL AMP
	109B	U, 2000	Urine	2,5	15	AMK GEN CRO CTX CAZ PIP ATM SXT CIP CHL AMP
	111B	U, 2000	Urine	2,5	15	CRO CTX CAZ PIP ATM SXT CHL AMP
XII	204A	T, 1995	Pus	0,8	15	TOB NET CRO CTX ATM SXT CIP CHL AMP
XIX	AC-54/97 ^e	V, 1997	Asp. bronchiale	2,5 e 2,4	16 e 5	AMK TOB GEN CRO CTX CAZ FEP PIP TZP ATM IMP SXT CIP CHL AMP
XXIII	60A	P, 1990	Pus	2,5	11	TOB NET GEN PIP ATM SXT CIP CHL AMP
	179A	R, 1993	ND	2,5	11	AMK TOB NET GEN CRO CTX CAZ FEP PIP ATM SXT CIP CHL AMP
	133A	P, 1989	Asp. bronchiale	2,5	11	AMK TOB NET GEN CRO CTX CAZ FEP PIP ATM SXT CIP CHL AMP
XXIV	1B	T, 1996	Urine	2,5	10,5	NETGEN CRO CTX PIP ATM SXT CIP CHL AMP
XXV	23B	T, 1997	Urine	2,2	3	AMKTOB NET CRO CTX ATM SXT CIP CHL AMP
	200A	T, 1995	Urine	2,2	3	AMKTOB NET CRO CTX ATM SXT CIP CHL AMP
XXVII	24A	T, 1997	Urine	2,5	11	TOB NET GEN CRO CAZ PIP TZP ATM SXT CHL AMP
XXVIII	114A	P, 1989	Pus	2,5	12,5	NET GEN CRO CTX PIP TZP ATM CHL AMP

^a A: Aviano; P: Padova; R: Roma; T: Trieste; U: Udine; V: Verona.

^b Sono indicate le resistenze ai seguenti antibiotici: Amikacina (AMK), Tobramicina (TOB), Netilmicina (NET), Gentamicina (GEN), Ceftriaxone (CRO), Cefotaxime (CTX), Cefotaxime (CAZ), Cefepime (FEP), Piperacillina (PIP); Piperacillina-Tazobactam (TZP), Aztreonam (ATM), Imipenem (IMP), Trimethoprim-Sulfametossazolo (SXT), Ciprofloxacina, (CIP), Cloramfenicolo (CHL), Ampicillina (AMP). La valutazione dell'antibiotico resistenza è stata eseguita mediante il metodo della diffusione in agar seguendo le direttive dell'NCCLS e utilizzando le sue tabelle di riferimento per l'interpretazione dei dati.

^c La dimensione degli amplificati è espressa in kb. Essi sono stato ottenuti con la coppia di primers 5'CS e 3'CS.

^d Bande (kb) di ibridazione ottenute con la sonda del gene *IntI1* dopo digestione del DNA genomico con *ClaI* e trasferimento dei frammenti ottenuti mediante Southern blot

^e Tale ceppo è caratterizzato da due distinti integroni di tipo 1

* Questi isolati veicolano anche un integrone di tipo 2.

3.13 Determinazione della localizzazione degli integroni di tipo 1 e del loro numero di copie

Tutti i ceppi integrone-positivi sono stati analizzati per verificare se l'elemento genico fosse associato a vettori plasmidici, come nelle Enterobacteriacee degli studi precedentemente citati.

L'analisi condotta mediante Southern blot, su DNA totale e su DNA digerito con l'enzima *ClaI*, utilizzando la sonda per il gene *intI1*, ha rilevato in tutti i ceppi un segnale di ibridazione positivo solo in corrispondenza del DNA cromosomico non digerito, anche se uno o più plasmidi erano chiaramente visibili dopo la separazione elettroforetica del DNA genomico. Viceversa, il segnale di ibridazione del ceppo di controllo *E.coli* J53/46 è stato evidenziato in corrispondenza del plasmide R46 (Recchia e Hall, 1995).

In tutti gli isolati, poi, ad eccezione del ceppo AC-54/97, è stata osservata, dopo digestione con *ClaI* e ibridazione con la sonda per il gene *intI1*, una singola banda di ibridazione di dimensioni variabili (Tabella 8B) che indica l'esistenza di una singola copia del gene ricercato. Solamente il ceppo AC-54/97 ha presentato due bande, in accordo con i dati precedenti che rilevano la presenza di due integroni in questo ceppo (Riccio et al., 2000). Le bande di ibridazione, inoltre, degli isolati appartenenti allo stesso gruppo ribotipico, hanno generalmente la medesima grandezza. Ciò confermerebbe la correlazione tra isolati all'interno dello stesso gruppo. Contrariamente, infatti, isolati appartenenti a gruppi diversi hanno bande di ibridazione di grandezza diversa (Tabella 8B).

I risultati ottenuti, quindi, hanno suggerito la presenza di un singolo integrone in tutti gli isolati ad eccezione di un unico ceppo (AC-54/97), e la probabile localizzazione cromosomica degli integroni. L'eterogeneità delle bande di ibridazione ottenute, digerendo il DNA con *ClaI*, ha reso infatti improbabile l'ipotesi che gli elementi genici siano localizzati su plasmidi comigranti con il cromosoma in tutti gli isolati.

Ad ulteriore conferma della localizzazione cromosomica dell'integrone con regione variabile di 2.5 Kb, sono stati condotti alcuni esperimenti di digestione del DNA genomico con l'enzima *I-CeuI*, che riconosce e taglia una sequenza di 26 basi interna al gene codificante l'rRNA 23S. I frammenti di restrizione sono stati separati in elettroforesi a campo pulsato (PFGE), trasferiti su membrana ed

ibridati con la sonda per il gene *intI1* e con quella già utilizzata per la ribotipizzazione, costituita da una miscela di cDNA corrispondenti agli rRNA 16S e 23S.

Dalla digestione sono stati ottenuti, come documentato in letteratura (Gralton et al., 1997), 7 frammenti (58, 141, 219, 444, 518, 1069 e 1333 Kb), che ibridano con la sonda complementare ai geni degli rRNA e che sono quindi di provata origine cromosomiale. Il segnale di ibridazione, al momento ottenuto solamente per il ceppo 100B, portatore dell'integrone con regione variabile di 2,5 Kb, è stato rilevato a livello del frammento di 518 Kbp (Figura 9).

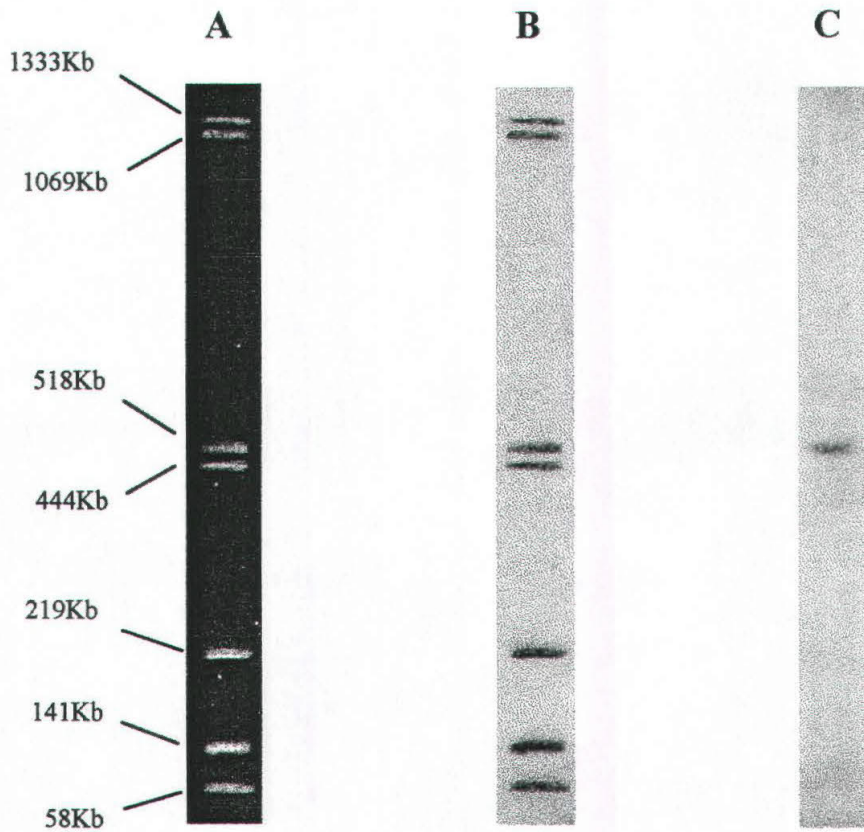
3.14 Correlazione tra antibiotico resistenza e presenza di integroni di tipo 1

Negli isolati integrone-positivi, si sono osservate le resistenze agli aminoglicosidici conferiti dai determinanti contenuti nelle cassette geniche veicolate dall'integrone. Tuttavia, la resistenza a uno o più aminoglicosidi è stata riscontrata anche in ceppi integroni-negativi, suggerendo che la resistenza non è sempre associata alla presenza dell'integrone di tipo 1. Tale dato non si è verificato, invece, per quanto concerne la resistenza all'imipenem, posseduta solamente dal ceppo AC-54/97, il primo ceppo italiano segnalato per la comparsa di tale resistenza (Cornaglia et al, 1999), il cui determinante è contenuto nella prima cassetta della regione variabile dell'integrone In42 (2400pb) (Riccio et al., 2000).

Gli antibiogrammi hanno indicato che i ceppi contenenti gli integroni sono resistenti ad un elevato numero di antibiotici rispetto a quelli che ne sono privi (Tabella 8A e 8B), suggerendo così che la presenza dell'integrone possa essere correlata all'elevata antibiotico resistenza osservata. Infatti, la correlazione tra multiresistenza ed integroni è risultata statisticamente significativa ($p < 0.001$, test del χ^2 con modificazione di Yates) (Tabella 9).

Tuttavia è giusto sottolineare che i geni contenuti nell'integrone non sono sufficienti da soli a spiegare i pattern di resistenza osservati. Infatti, come è stato dimostrato dal sequenziamento, gli integroni veicolano da 1 a 4 cassette come massimo.

Figura 9. Localizzazione del gene *intI1* nel ceppo 100B



I frammenti di DNA genomico, ottenuti in seguito a digestione con l'enzima *I-CeuI*, sono stati separati mediante PFGE (A), trasferiti su membrana di Nylon ed ibridati (B) con la miscela di cDNA complementari agli rRNA 16 e 23S e poi (C) con la sonda per il gene dell'integrasi di tipo 1 (*IntI1*).

Tabella 9. Correlazione tra presenza di integroni di tipo1 ed antibiotico-resistenza nei ceppi di *A. baumannii*

Antibiotico	Isolati integroni positivi	Isolati integroni negativi	Significatività statistica (p) [§]
	(n°=16) [^]	(n°=20)	
	n° di isolati resistenti* (%)	n° di isolati resistenti* (%)	
Amikacina	11 (69)	2 (10)	<0.001
Tobramicina	9 (56)	3 (15)	<0.01
Netilmicina	11 (69)	1 (5)	<0.001
Gentamicina	13 (81)	3 (15)	<0.001
Ceftriaxone	15 (94)	8 (40)	<0.001
Cefotaxime	15 (94)	7 (35)	<0.001
Ceftazidime	12 (75)	4 (20)	<0.001
Cefepime	3 (19)	1 (5)	NS
Piperacillina	15 (94)	5 (25)	<0.001
Piperacillina-Tazobactam	3 (19)	4 (20)	NS
Aztreonam	16 (100)	11 (55)	<0.005
Imipenem	1 (6)	0	NS
Trimethoprim-Sulfametossazolo	15 (94)	6 (30)	<0.001
Ciprofloxacina	12 (75)	2 (10)	<0.001

[^] sono stati considerati solo i ceppi integroni positivi non geneticamente correlati

*La valutazione della suscettibilità è stata eseguita mediante il test di Kirby-Bauer, seguendo le linee guida dell'NCCLS ed utilizzando le sue tabelle di riferimento per l'interpretazione dei dati.

§ E' stato utilizzato il test del χ^2 con modificazione di Yates. NS: statisticamente non significativo

Inoltre, come è emerso dagli esperimenti di Southern blot, non sono stati rilevati altri integroni di tipo 1, che per ragioni strutturali potrebbero essere non amplificabili.

E' stato quindi ipotizzato che gli integroni possano essere associati ad altre strutture geniche, come ad esempio a trasposoni. Questi infatti, veicolando altri determinanti genici per antibiotico-resistenza, potrebbero spiegare la multiresistenza osservata nei ceppi integrasi-positivi.

3.15 Ricerca del gene *intI2**

La presenza del gene *intI2** è stata ricercata nei 40 ceppi di *Acinetobacter baumannii* mediante amplificazione di un frammento di 257pb. Come controllo positivo è stato utilizzato il plasmide R483 (Heikkilä et al., 1991). Un amplificato delle dimensioni attese è stato riscontrato in 3 ceppi (7.5%), due dei quali, con la ribotipizzazione, sono risultati appartenere allo stesso gruppo VI (2B e 24B), mentre il terzo (100B) al gruppo VII (Tabella 8B). Tali ceppi, isolati in anni diversi e provenienti dall'ospedale di Trieste, sono risultati portatori anche dell'integrone di tipo 1 con un inserto di 2.5 Kb. Allo stato attuale la caratterizzazione di questi integroni non è ancora stata eseguita. Non è stato stabilito, ad esempio, quali cassette geniche essi veicolano oppure se si tratta di integrone vuoti. La caratterizzazione è peraltro resa difficoltosa dalla mancanza di una regione conservata al 3' (Heikkilä et al., 1991).

I risultati ottenuti hanno indicato, come riportato da altri studi condotti su *Acinetobacter*, una bassa frequenza del gene *intI2** (Ploy et al., 2000; Seward e Towner, 1999; Gallego e Towner, 2001; Koeleman et al., 2001). Unica eccezione è data dallo studio condotto su ceppi clinici di *Acinetobacter baumannii* isolati in un ospedale cileno (Gonzales et al., 1998). Questo è l'unico lavoro in cui è stata dimostrata una predominanza di integroni di tipo 2 (53%) rispetto al tipo 1 (5%) in ceppi di *A. baumannii* multiresistenti, risultati appartenere al biotipo 8 e 9. I ceppi del nostro studio, tuttavia, non sono stati caratterizzati in tal senso e quindi non possiamo effettivamente sapere se essi appartengono ai biotipi citati. Si può comunque affermare che gli integroni di tipo 2 non sembrano giocare un ruolo importante nella diffusione dell'antibiotico-resistenza nei ceppi italiani di *A. baumannii*.

3.16 Ricerca di pompe di efflusso

Per verificare la presenza di pompe di efflusso sono state determinate le MIC di 22 ceppi, di cui 12 integroni positivi, nei confronti della Ciprofloxacina, dell'Aztreonam e del Cloramfenicolo in presenza ed assenza di un inibitore dei sistemi di efflusso (Mc-207,110). I dati ottenuti hanno indicato che l'Mc-207,110 ha determinato solo in 5 su 22 ceppi una diminuzione di almeno 4 volte del valore delle MIC osservate, suggerendo così l'ipotesi, come documentato in letteratura, della presenza di un meccanismo di espulsione attiva del/i farmaco/i dalla cellula batterica. Le MIC dei 5 ceppi per i quali si è osservato un effetto dell'inibitore sono riportate in tabella 10. Per convalidare ulteriormente questo dato, è stato ricercato, mediante amplificazione genica, uno dei tre geni (*adeB*) che codifica per una delle proteine costituenti il sistema di efflusso *adeABC* recentemente scoperto in *Acinetobacter baumannii* (Magnet et al., 2001). Tuttavia, da questo primo screening è emerso che tale determinante genico è presente in tutti i ceppi di *Acinetobacter baumannii* qui considerati. E' possibile che solo alcuni ceppi esprimano il sistema di pompe di efflusso. Il meccanismo di regolazione trascrizionale a livello del sistema operonico risulterebbe quindi molto importante (Webber e Piddock, 2003).

E' giusto sottolineare che queste considerazioni sono state fatte analizzando un numero ristretto di ceppi e valutando solamente le MIC di tre antibiotici.

Tabella 10. Effetto dell'inibitore Mc-207,110 sulle MIC ($\mu\text{g/ml}$) della Ciprofloxacina (CIP), dell'Aztreonam (AZT) e del Cloramfenicolo (CHL) su ceppi selezionati di *A. baumannii*

ceppo	CIP	CIP*	AZT	AZT*	CHL	CHL*
2B	32	8	64	32	256	256
24B	8	2	256	256	>256	256
92A	ND	ND	64	<8	256	64
121A	8	2	128	64	64	16
176A	32	8	256	128	256	128

I valori delle MIC ottenuti sono espressi in $\mu\text{g/ml}$.

*Determinazione della MIC in presenza dell'inibitore Mc-207,110.

ND: non determinato in quanto il ceppo è risultato sensibile all'antibiotico con il test di diffusione in agar.

4. CONCLUSIONI

In questo lavoro è stata valutata la diffusione e l'importanza degli integroni nella trasmissione di antibiotico-resistenze nel genere *Acinetobacter*.

La fase iniziale della ricerca è consistita nella creazione di un ceppario comprendente batteri sia di origine clinica che ambientale. I primi (63 ceppi) sono stati forniti dai laboratori di 6 ospedali italiani, mentre i secondi (58 ceppi) sono stati ricercati ed isolati, con terreni appropriati, direttamente da campioni di origine ambientale.

Gli studi finora effettuati hanno indicato che *Acinetobacter baumannii* e *Acinetobacter* genomospecie 3, isolati prevalentemente da materiale clinico, (Seifert et al., 1993; Amyes e Young, 1996) sono in grado di sviluppare facilmente antibiotico-resistenze, mentre pochi sono i dati riguardanti il livello di antibiotico-resistenze ed i meccanismi di acquisizione dei geni R di quelle specie a prevalente diffusione ambientale (Guardabassi et al., 1999; Carr et al., 2001). Per tale motivo, prima di valutare il livello di antibiotico-resistenza, si è ritenuto interessante identificare correttamente a livello di specie genomica tutti i ceppi dello studio.

L'identificazione di specie ha presentato, tuttavia, diverse difficoltà a causa dell'inadeguatezza dei sistemi di identificazione disponibili. Dei 121 ceppi analizzati solamente 90, di cui 56 di origine clinica e 34 di origine ambientale, sono stati identificati con i metodi genotipici (ARDRA o PCR-ribotyping) (Vanechoutte et al, 1995; Dolzavi et el., 1995) nell'ambito di 13 genomospecie note (Dijkshoorn et al., 1998; Seifert et al., 1997; Nemeč et al., 2000; Nemeč et al., 2001; Vanechoutte et al., 1999). I rimanenti isolati, corrispondenti a 7 ceppi clinici (11%) e a 24 ambientali (41%), non sono stati identificati, lasciando ipotizzare che, in alcuni casi, gli *Acinetobacter* potessero appartenere a genomospecie nuove o fossero varianti di genomospecie già descritte.

Anche la successiva caratterizzazione fenotipica dei ceppi ambientali ha evidenziato una diversità tra gli isolati superiore a quella delle genomospecie note (Bouvet e Jeanjean, 1995; Tjernberg e Ursing, 1989; Kämpfer et al., 1993; Bouvet e Grimont, 1986; Gerner-Smidt et al., 1991; Nemeč et al., 2001; Vanechoutte et

al., 1999). Sono risultati molto interessanti, a questo proposito, i dati riguardanti 5 isolati, che non sono stati identificati con metodi genotipici e fenotipici. Essi presentavano sia combinazioni ARDRA atipiche, caratterizzate da un nuovo pattern di restrizione *RsaI* definito “n”, sia tratti fenotipici, tra loro molto omogenei, ma non riconducibili a nessuna genomospecie nota. I risultati del sequenziamento delle prime 600 pb del gene rRNA 16S di uno di questi isolati, confermerebbero la possibile appartenenza di questi ceppi ad una specie non ancora descritta. Per la conferma definitiva sarà necessario eseguire il test di ibridazione DNA/DNA. Questi dati sottolineano ancora una volta come la tassonomia del genere *Acinetobacter* non abbia ancora raggiunto un assetto soddisfacente.

La successiva valutazione della suscettibilità a 16 antibiotici di uso clinico, ha evidenziato che gli isolati resistenti agli antibiotici non sono uniformemente distribuiti tra le diverse genomospecie identificate.

Tra tutti gli isolati analizzati, i batteri identificati come *A. baumannii* (il più importante patogeno del genere, isolabile solo da materiale clinico) sono quelli che più frequentemente veicolano antibiotico-resistenze, mentre gli altri, tranne alcune eccezioni, sono sensibili alla maggior parte degli antibiotici saggiati. Tra le resistenze osservate, quelle nei confronti dell’ampicillina (55%), dell’aztreonam (54%) e del cloramfenicolo (52%), sono risultate molto diffuse nei ceppi dello studio, suggerendo che alcune specie di *Acinetobacter* possono essere intrinsecamente resistenti a questi antibiotici.

Poiché, in questo genere, sono ancora poco noti i meccanismi tramite i quali i geni R vengono acquisiti e trasmessi, il lavoro è proseguito ricercando nei ceppi analizzati la presenza di integroni (Recchia e Hall, 1995).

Gli integroni di tipo 1 sono stati trovati esclusivamente in *A. baumannii*, dove sono stati rilevati con una frequenza del 50% (20/40). La successiva caratterizzazione molecolare ha indicato, tuttavia, una limitata variabilità nella tipologia e nell’ordine di inserimento delle cassette geniche. In questo studio sono stati trovati quattro integroni diversi, caratterizzati da inserti rispettivamente di 0.8 Kb, 2.2 Kb, 2.4 Kb e 2.5 Kb. Quest’ultimo integrone, la cui sequenza ha dimostrato un’omologia molto elevata con parte di un inserto di un integrone di tipo 1 descritto in Enterobatteriacee, è stato riscontrato, sorprendentemente, in 17 dei 20 *A. baumannii* integrasi positivi. Con l’esclusione di 8 ceppi di cui si

ipotizzava l'appartenenza a due cluster epidemici, gli isolati non sono risultati genotipicamente correlati. In base ai dati ottenuti con la tipizzazione, essi sono risultati appartenere a 8 gruppi ribotipici diversi.

I risultati suggeriscono, quindi, che l'integrone sia una struttura nell'insieme molto conservata, ed in modo particolare, contrariamente a quanto si era ipotizzato inizialmente, lo sia la regione variabile.

Un'ipotesi che spiegherebbe la presenza della stessa struttura conservata in ceppi genotipicamente differenti, è che essa possa essere stata acquisita prima della differenziazione di tali ceppi. L'acquisizione può essere avvenuta ad esempio mediante trasformazione naturale, un meccanismo genetico frequente nel genere *Acinetobacter* (Towner, 1996), oppure tramite coniugazione. Infatti, in base a quanto detto precedentemente, l'integrone con inserto di 2.5 Kb presenta lo stesso arrangiamento di cassette che è stato descritto come parte della regione variabile di un integrone di tipo 1 trovato in altri batteri Gram negativi. Almeno in due di loro, *Klebsiella oxytoca* (Preston et al., 1999) e *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium (Tosini et al., 1998; Villa et al., 2000), la struttura è veicolata da plasmidi IncL/M. Plasmidi di tale gruppo di incompatibilità, di cui è nota l'instabilità in *Acinetobacter baumannii* (Chopade et al., 1985), possono tuttavia essere rimasti nella cellula un tempo sufficiente per consentire il trasferimento genico.

Una seconda ipotesi, invece, suggerisce che gli integroni siano stati acquisiti e poi trasferiti per via orizzontale da un ceppo all'altro. Anche in questo caso, dato che l'integrone non è di per sé un elemento mobile, la trasformazione naturale o la coniugazione possono aver giocato un ruolo molto importante. Per questo motivo è stato ritenuto interessante determinare la localizzazione dell'integrone. I risultati degli esperimenti di Southern blot, condotti con la sonda complementare al gene *intI1*, hanno rivelato che gli integroni non sono veicolati da plasmidi, ma sono inseriti nel DNA cromosomico in singola copia. E' stato quindi ipotizzato che gli integroni possano essere associati ad altre strutture genetiche mobili, come ad esempio, a trasposoni, un fatto questo abbastanza frequente (Recchia e Hall, 1995). Tale associazione potrebbe anche spiegare la correlazione risultata statisticamente significativa tra la presenza di integroni di tipo 1 e la multiresistenza osservata. (Martinez-Frejo et al., 1998; Koeleman et al., 2001). I

trasposoni, infatti, potrebbero veicolare altri geni R oltre a quelli contenuti negli integroni.

Nell'ultima parte del lavoro si è ritenuto interessante ricercare nei ceppi di *A. baumannii* l'eventuale presenza sia di integroni di tipi diversi (nel caso specifico è stato ricercato il gene per l'integrasi di tipo 2) che di meccanismi di antibiotico-resistenza alternativi. Nel primo caso il gene *intI2** è stato individuato in 3 dei 40 ceppi di *Acinetobacter baumannii*, già portatori dell'integrone di tipo 1 con un inserto di 2.5 Kb. I risultati ottenuti hanno indicato, come riportato da altri studi condotti su *Acinetobacter*, una bassa frequenza del gene (7,5%) (Ploy et al., 2000; Seward e Towner, 1999; Gallego e Towner, 2001; Koeleman et al., 2001) e, conseguentemente, hanno suggerito che gli integroni di tipo 2 non hanno un ruolo importante nella diffusione dell'antibiotico-resistenza nei ceppi di *A. baumannii* qui esaminati.

Risultati interessanti, anche se ancora preliminari, sono quelli che hanno indicato la presenza, in un campione di 22 *A. baumannii* (integrone positivi e negativi), del gene *adeB*, parte dell'operone che codifica il sistema di pompe di efflusso *adeABC*. Tale sistema, che è in grado di espellere attivamente i farmaci dalla cellula, rendendo il batterio resistente ad una gran numero di chemioterapici, è stato descritto per la prima volta da Magnet (Magnet et al, 2001) ed individuato, dallo stesso autore, in 5 ceppi di *A. baumannii* multiresistenti. Fino a questo momento, non ci sono studi che riportano la frequenza del gene *adeB* nella popolazione di *Acinetobacter baumannii*. Poiché il gene è stato da noi individuato anche in ceppi, le cui resistenze non risentono dell'attività dell'inibitore di pompe di efflusso, i nostri dati, nonostante il numero dei ceppi debba in futuro essere incrementato, indicano che tale gene potrebbe essere presente in tutti gli isolati. Il significato della sua presenza, in relazione ad un sistema di efflusso funzionante, è ancora da valutare.

5. BIBLIOGRAFIA

- ◆ **Anad K. S. and D. Schlessinger.** (1990). Mechanism and regulation of bacterial ribosomal RNA processing. *Ann. Rev. Microbiol.* 44: 105-129.
- ◆ **Amyes S. G. B. and H.-K. Young.** (1996). Mechanisms of antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp.—Genetics of resistance. In: *Acinetobacter* microbiology, epidemiology, infections, management. E. Bergogne-Bérézin, M L. Joly-Guillou and K. J. Towner Eds., CRC press, Boca Raton, Florida. pp: 185-223.
- ◆ **Arakawa Y., M. Murakami, K. Suzuki, H. Ito, R. Wacharotayankun, S. Ohsuka, N. Kato and M. Ohta.** (1995). A novel integron-like element carrying the metallo- β -lactamase gene *bla*_{IMP}. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 1612-1615.
- ◆ **Barberio C. and R. Fani.** (1998). Biodiversity of an *Acinetobacter* population isolated from activated sludge. *Res. Microbiol.* 149: 665-673.
- ◆ **Baumann P.** (1968). Isolation of *Acinetobacter* from soil and water. *J. Bacteriol.* 96: 39-42.
- ◆ **Bergogne-Bérézin E.** (1996). Resistance of *Acinetobacter* spp. to antimicrobials.—Overview of clinical resistance patterns and therapeutic problems. In: *Acinetobacter* microbiology, epidemiology, infections, management. E. Bergogne-Bérézin, M L. Joly-Guillou and K. J. Towner Eds., CRC press, Boca Raton, Florida. pp: 133-183.
- ◆ **Bergogne-Bérézin E. and K. J. Towner** (1996). *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin. Microbiol. Rev.* 9:148-165.
- ◆ **Birmboim H. C. and J. Doly.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research.* 7: 1513-1523.
- ◆ **Boehringer Mannheim GmbH.** (1993). The DIG system user's manual for filter hybridization. *Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica, Mannheim, Germany.*

- ◆ **Bonnet R., H. Marchandin, C. Chanal, D. Sirot, R. Labia, C. De Champs, E. Jumas-Bilak and J. Sirot.** (2002). Chromosome-encoded class D β -lactamase OXA-23 in *Proteus mirabilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 2004-2006.
- ◆ **Bouvet P. J. M. and P. A. D. Grimont.** (1986). Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. Nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36**: 228-240.
- ◆ **Bouvet P. J. M. and S. Jeanjean.** (1989). Delineation of new proteolytic genomic species in the genus *Acinetobacter*. *Res. Microbiol.* **140**: 291-299.
- ◆ **Bouvet P. J. M. and S. Jeanjean.** (1995). Differentiation of *Acinetobacter calcoaceticus* sensu stricto from related *Acinetobacter* species by electrophoretic polymorphism of malate dehydrogenase, glutamate dehydrogenase and catalase. *Res. Microbiol.* **146**: 773-785.
- ◆ **Brisou J. and A. R. Prévot.** (1954). Etudes de systématique bactérienne. X-Révision des espèces réunies dans le genre *Achromobacter*. *Ann. Ist. Pasteur.* **86**: 722-728.
- ◆ **Carattoli A.** (2001). Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Vet. Res.* **32**: 243-259.
- ◆ **Carr E., H. Eason, S. Feng, A. Hoogenraad, R. Croome, J. Soddell, K. Lindra and R. Seviour,** (2001). RAPD-PCR typing of *Acinetobacter* isolates from activated sludge systems designed to remove phosphorus microbiologically. *J. Appl. Microbiol.* **90**: 309-319
- ◆ **Chastre J., J.-L. Trouillet, A. Vuagnat and M.-L. Joly-Guillou.** (1996). Nosocomial pneumonia caused by *Acinetobacter* spp. In: *Acinetobacter* microbiology, epidemiology, infections, management. E. Bergogne-Bérézin, M L. Joly-Guillou and K. J. Towner Eds., CRC press, Boca Raton, Florida. pp: 117-132.
- ◆ **Chopade B. A., P. J. Wise and K. J. Towner.** (1985). Plasmid transfer and behaviour in *Acinetobacter calcoaceticus* EBF65/65. *J.Gen. Microbiol.* **131**: 2805-2811.

- ◆ **Chu Y.-W., M. Afzal-Shah, E. T. S. Houang, M.-F. I. Palepou, D. J. Lyon, N. Woodford and D.M. Livermore** (2001). IMP-4, a novel metallo- β -lactamase from nosocomial *Acinetobacter* spp. collected in Hong Kong between 1994 and 1998. gene *bla*_{IMP}. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 710-714.
- ◆ **Clark C. A., L. Purins, P. Kaewrakon, T. Focareta and P. A. Manning** (2000). The *Vibrio cholerae* O1 chromosomal integron. *Microbiology* 146: 2605-2612
- ◆ **Cornaglia G., M. L. Riccio, A. Mazzariol, L. Lauretti, R. Fontana, G.M. Rossolini** (1999). Appearance of IMP-1 metallo- β -lactamase in Europe. *Lancet.* 353: 899-900.
- ◆ **Da Silva G., R. Leitao, L. Peixe.** (1999). Emergence of carbapenem-hydrolyzing enzymes in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* 37: 2109-2110.
- ◆ **Dice L.R.** (1945). Measure of amount of ecological association between species. *Ecology* 26: 297-302.
- ◆ **Dijkshoorn L. and J. van der Toorn.** (1992). *Acinetobacter* species: Which do we mean? *Clin. Infect. Dis.* 15: 748-749.
- ◆ **Dijkshoorn L.** (1996). *Acinetobacter* microbiology. In: *Acinetobacter* microbiology, epidemiology, infections, management. E. Bergogne-Bérénzin, M L. Joly-Guillou and K. J. Towner Eds., CRC press, Boca Raton, Florida. pp: 37-69.
- ◆ **Dijkshoorn L., H. Aucken, P. Gerner-Smidt, P. Janssen, M.E. Kaufmann, J. Garaizar, J. Ursing, and T. L. Pitt.** (1996). Comparison of Outbreak and Nonoutbreak *Acinetobacter baumannii* Strain by Genotypic and Phenotypic Methods. *J. Clin. Microbiol.* 34:1519-1525.
- ◆ **Dijkshoorn L., B. van Harssellar, I. Tjernberg, P.J.M. Bouvet and M. Vanechoutte** (1998). Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis for identification of *Acinetobacter* genomic species. *System. Appl. Microbiol.* 21:33-39
- ◆ **Dolzani L., E. Tonin, C. Lagatolla, L. Prandin, and C. Monti-Bragadin.** (1995). Identification of *Acinetobacter* isolates in the *A.calcoaceticus-A.*

baumannii complex by restriction analysis of the 16S-23S rRNA intergenic spacer sequences. *J. Clin. Microbiol.* 33: 1108-1113.

- ◆ **Ehrenstein B., A. T. Bernards, L. Dijkshoorn, P. Gerner-Smidt, K. J. Towner, P. J. M. Bouvet, F. D. Daschner and H. Grundmann.** (1996). *Acinetobacter* species identification by using tRNA spacer fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* 34: 2414-2420.
- ◆ **Gallego L. and K. J. Towner.** (2001). Carriage of class I integrons and antibiotic resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from northern Spain. *J. Med. Microbiol.* 50: 71-77.
- ◆ **Gerner- Smidt P., I. Tjernberg, and J. Ursing.** (1991). Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. *J. Clin. Microbiol.* 29: 277-282.
- ◆ **Gerner-Smidt P.** (1992). Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* complex. *J. Clin. Microbiol.* 30: 2680-2685.
- ◆ **Gombac F., M. L. Riccio, G. M. Rossolini, C. Lagatolla, E. Tonin, C. Monti-Bragadin, A. Lavenia and L. Dolzani.** (2002). Molecular characterization of integrons in epidemiologically unrelated clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from Italian hospitals reveals a limited diversity of cassette array. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:3665-3668.
- ◆ **Gonzalez G., K. Sossa, H. Bello, M. Dominguez, S. Mella, R. Zemelman.** (1998). Presence of integrons in isolates of different biotypes of *Acinetobacter baumannii* from Chilean hospitals. *FEMS Microbiology Letters.* 161:125-128.
- ◆ **Gralton E. M., A. L. Campbell and E. L. Neidle.** (1997). Directed introduction of DNA cleavage sites to produce a high-resolution genetic and physical map of the *Acinetobacter* sp. strain ADP1 (BD413UE) chromosome, *Microbiology.* 143: 1345-1357.
- ◆ **Grehn M. and A. von Graevenitz.** (1978). Search for *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. *anitratu*s: enrichment of fecal samples. *J. Clin. Microbiol.* 8: 342-343.
- ◆ **Guardabassi L., A. Dalsgaard and J. E. Olsen.** (1999). Phenotypic characterization and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. isolated from aquatic sources. *J. Appl. Microbiol.* 87: 659-667.

- ◆ **Hall R. M., H. J. Brown, D. E. Brookes and H. W. Stokes.** (1994). Integrons found in different locations have identical 5' ends but variable 3' ends. *J. Bacteriol.* 176: 6286-6294.
- ◆ **Heidelberg J. F., J. A. Eisen, W. C. Nelson, R. A. Clayton, M. L. Gwinn, R. J. Dodson, D. H. Haft, E. K. Hickey, J. D. Peterson, L. Umayam, S. R. Gill, K. E. Nelson, T. D. Read, H. Tettelin, D. Richardson, M. D. Ermolaeva, J. Vamathevan, S. Bass, H. Qin, I. Dragoi, P. Sellers, L. McDonald, T. Utterback, R. D. Fleishmann, W. C. Nierman, O. White, S. L. Salzberg, H. O. Smith, R. R. Colwell. J. J. Mekalanos, J. C. Venter and C. M. Fraser.** (2000). Dna sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature.* 406: 477-483.
- ◆ **Heikkilä E., L. Sundström, M. Skurnik, and P. Huovinen.** (1991). Analysis of genetic localization of the type I trimethoprim resistance gene from *Escherichia coli* isolated in Finland. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35:1562-1569.
- ◆ **Janssen P. and L. Dijkshoorn.** (1996). High resolution DNA of *Acinetobacter* outbreak strain. *FEMS Microbiology Letters*, 142: 191-194.
- ◆ **Jaward A., P. M. Hawkey, J. Heritage and A. M. Snelling.** (1994). Description of Leeds *Acinetobacter* Medium, a new selective and differential medium for isolation of clinically important *Acinetobacter* spp., and comparison with Herellea agar and Holton's agar. *J. Clin. Microbiol.* 32: 2353-2358.
- ◆ **Juni E.** (1972). Interspecies transformation of *Acinetobacter* genetic evidence for a ubiquitous genus. *J. Bacteriol.* 112: 917-931.
- ◆ **Kämpfer P. and Altwegg.** (1992). Numerical classification and identification of *Aeromonas* genomospecies. *J. Appl. Bacteriol.* 72:342-351.
- ◆ **Kämpfer P., I. Tjernberg and J. Ursing.** (1993). Numerical classification and identification of *Acinetobacter* genomic species. *J. Appl. Bacteriol.* 75: 259-268.
- ◆ **Koeleman J. G. M., J. Stoof, M. W. Van der Bijl, C. M. J. E. Vandenbroucke-Grauls and P. H. M. Savelkoul.** (2001). Identification of epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* by integrase gene PCR. *J. Clin. Microbiol.* 39: 8-13.

- ◆ **Kostman J. R., T. D. Edlind, J. J. LiPuma and T. L. Stull.** (1992). Molecular epidemiology of *Pseudomonas cepacia* determined by polymerase chain reaction ribotyping. *J. Clin. Microbiol.* 30: 2084-2087.
- ◆ **Kuah B. G., G. Kumarasinghe, J. Doran and H. R. Chang.** (1994). Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from Singapore. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 2502-2503.
- ◆ **Lion T. and O. A. Hass.** (1990). Nonradioactive labeling of probe with digoxigenin by Polymerase Chain Reaction. *Anal. Biochemistry* 188: 335-337.
- ◆ **Lagatolla C., A. Lavenia, E. Tonin, C. Monti-Bragadin and L. Dolzani.** (1998). Characterization of oligonucleotide probes for the identification of *Acinetobacter* spp., *A. baumannii* and *Acinetobacter* genomic species 3. *Res. Microbiol.* 149: 557-566.
- ◆ **Lapage S. P., S. Bascomb, W. R. Willcox and M. A. Curtis.** (1977). Identification of bacteria by computer: general aspects and perspectives. *J. General Microbiol.* 77: 273-290.
- ◆ **Lévesque C., L. Piché, C. Larose, and P. H. Roy.** (1995). PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:185-191.
- ◆ **Levi I. and E. Rubinstein.** (1996). *Acinetobacter* Infections—Overview of clinical features. In: *Acinetobacter* microbiology, epidemiology, infections, management. E. Bergogne-Bérézin, M L. Joly-Guillou and K. J. Towner Eds., CRC press, Boca Raton, Florida. pp:101-115.
- ◆ **Magnet S., P. Courvalin and T. Lambert.** (2001). Resistance-Nodulation-Cell Division-Type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 3375-3380.
- ◆ **Maron D. M. and B. N. Ames.**(1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res.* 113: 173-212.
- ◆ **Martinez-Freijo P., A. F. Fluit, F.-J. Schmitz, V. S. C. Grek, J. Verhoef and M. E. Jones.** (1998). Class I integrons in Gram-negative isolates from different European hospitals and association with decreased susceptibility to multiple antibiotic compounds. *J. Antimicro. Chemother.* 42: 689-696.

- ◆ **Martinez-Freijo P., A. F. Fluit, F.-J. Schmitz, J. Verhoef and M. E. Jones.** (1999). Many class I integrons comprise distinct stable structures occurring in different species of *Enterobacteriaceae* isolated from widespread geographic regions in Europe. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:686-689.
- ◆ **Mazel D., B. Dychinco, V. A. Webb and J. Davis.** (1998). A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome. *Science.* 208: 605-608.
- ◆ **Naas T., W. Sougakoff, A. Casetta and P. Nordmann.** (1998). Molecular characterization of OXA-20, A novel class D β -lactamase, and its integron from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2074-2083.
- ◆ **National Committee for Clinical Laboratory Standards** (2000). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test; approved standard-seventh edition (M2-A7). National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
- ◆ **National Committee for Clinical Laboratory Standards** (2001). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing; Eleventh informational supplement (M1000-S11). National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa
- ◆ **Nield B. S., A. J. Holmes, M. R.Gillings, G. D. Recchia, B. C. Mabbutt, K. M. H. Nevalainen and H. W. Stokes.** (2001). Recovery of new integron classes from environmental DNA. *FEMS Microbiol. Lett.* 195:59-65.
- ◆ **Nemec A., L. Dijkshoorn and P. Jezek** (2000). Recognition of two novel phenons of the genus *Acinetobacter* among non-glucose-acidifying isolates from human specimens. *J. Clin. Microbiol.* 38: 3937-3941.
- ◆ **Nemec A., T. De Baere, I. Tjernberg, M. Vaneechoutte, T.J.K. Van der Reijden and L. Dijkshoorn** (2001). *Acinetobacter ursingii* sp. nov. and *Acinetobacter schindleri* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *Int J. System and Evol. Microbiol.* 51:1891-1899.
- ◆ **Nikaido H.** (1998). Multiple antibiotic resistance and efflux. *Current Opinion in Microbiology.* 1: 516-523.
- ◆ **Nowak A. and J. Kur.** (1995). Genomic species typing of acinetobacters by polymerase chain reaction amplification of the *recA* gene. *FEMS Microbiol. Lett.* 130: 327-332.

- ◆ **Oh J. Y., K. S. Kim, Y. W. Jeong, J. W. Cho, J. C. Park and J. C. Lee** (2002). Epidemiological typing and prevalence of integrons in multiresistant *Acinetobacter* strains. *APMIS* 110: 247-252.
- ◆ **Pandey A., A. Kapil, S. Sood, V. Goel, B. Das and P. Setu.** (1998). In vitro activities of ampicillin-sulbactam and amoxicillin-clavulanic acid against *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin Microbiol.* 36: 3415-3416.
- ◆ **Ploy M.-C, F. Denis, P. Courvalin, and T. Lambert.** (2000). Molecular characterization of integrons in *Acinetobacter baumannii*: description of a hybrid class 2 integron. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 2684-2688.
- ◆ **Perilli M., A. Felici, A. Oratore, G. Cornaglia, G. Bonfiglio, G. M. Rossolini, and G. Amicosante.** (1996). Characterization of the chromosomal Cephalosporinases Produced by *Acinetobacter lwoffii* and *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:715-719.
- ◆ **Petersen A. L., A. Guardabassi, A. Dalsgaard and J. E. Olsen.** (2000). Class I integrons containing a *dhfrI* trimethoprim resistance gene cassette in aquatic *Acinetobacter* spp. *FEMS Microbiol. Lett.* 182: 73-76.
- ◆ **Poole K.** (2001). Multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Current Opinion in Microbiology.* 4: 500-508.
- ◆ **Preston K. E., C. C. A. Radomski and R. A. Venezia.** (1999). The cassettes and 3' conserved segment of an integron from *Klebsiella oxytoca* plasmid pACM1. *Plasmid* 42: 104-114.
- ◆ **Ramirez C., C. Pinp, G. Gonzalez, H. Bello, M. Dominguez, S. Mella, R. Zemelman, H.K. Young and S. Amyes.** (2000). Presence of integrons and their relationships with the resistance to third generation cephalosporins among nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Rev. Med. Chil.* 128:863-867.
- ◆ **Recchia G. D. and R. M. Hall.** (1995). Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology.* 141:3015-3027.
- ◆ **Ribera A., J. Ruitz, M. T. Jimenez de Anta and J. Vila.** (2002). Effect of an efflux pump inhibitor on the MIC of nalidixic acid for *Acinetobacter baumannii* and *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 49: 697-698

- ◆ **Riccio M. L., N. Franceschini, L. Boschi, B. Caravelli, G. Cornaglia, R. Fontana, G. Amicosante and G. M. Rossolini. (2000).** Characterization of the determinant of the metallo- β -lactamase *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 1229-1235.
- ◆ **Riccio M.L., L. Pallecchi, R. Fontana, and G.M. Rossolini. (2001).** In70 of plasmid pAX22, a *bla_{VIM-1}*-containing integron carrying a new aminoglycoside phosphotransferase gene cassette. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 1249-1253.
- ◆ **Seifert H., R. Baginski, A. Schulze and G. Pulverer. (1993).** Antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 750-753.
- ◆ **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.
- ◆ **Seifert H., Dijkshoorn L., P. Gerner-Smidt, N. Pelzer, I. Tjernberg and M. Vanechoutte. (1997).** Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2819-1825.
- ◆ **Senda K., Y. Arakawa, S. Ichiyama, K. Nakashima, H. Ito, S. Ohsuka, K. Shimokata, N. Kato and M. Ohta. (1996).** PCR detection of metallo- β -lactamase gene (*bla_{IMP}*) in Gram-negative rods resistant to broad-spectrum β -lactamase. *J. Clin. Microbiol.* 34: 2909-2913.
- ◆ **Seward R. J., T. Lambert and K. J. Towner. (1998).** Molecular epidemiology of aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* spp. *J. Med. Microbiol.* 47:455-462.
- ◆ **Seward R. J. and K. J. Towner. (1999).** Detection of integrons in worldwide nosocomial isolates of *Acinetobacter* spp. *Clin. Microbiol. Infect.* 5: 308-318.
- ◆ **Shaw K. J., P. N. Rather, R. S. Hare and G. H. Miller. (1993).** Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol. Rev.* 57: 138-163.
- ◆ **Stokes H. W., A. J. Holmes, B. S Nield, M. P. Holley, K. M. H. Nevalainen, B. C. Mabbutt and M. R.Gillings. (2001).** Gene cassette PCR:

sequence-independent recovery of entire genes from environmental DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5240- 5246.

- ◆ **Tosini F., P. Visca, I. Luzzi, A. M. Dionisi, C. Pezzella, A. Petrucca and A. Carattoli.** (1998). Class I integron-borne multiple-antibiotic resistance carried by IncFI and IncL/M plasmids in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:3053-3058.
- ◆ **Towner K. J.** (1996). Biology of *Acinetobacter* spp. In: *Acinetobacter* microbiology, epidemiology, infections, management. E. Bergogne-Bérézin, M L. Joly-Guillou and K. J. Towner (Eds.),CRC Press, Boca Raton, Florida. pp: 13-36.
- ◆ **Tjernberg I. and J. Ursing.** (1989). Clinical strain of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. *APMIS.* 97: 595-605.
- ◆ **Vanechoutte M., Dijkshoorn L., I. Tjernberg, A. Elaichouni, P. da Vos, G. Claeys and G. Verschraegen.** (1995). Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal restriction analysis. *J.Clin. Microbiol.* 33: 5-11.
- ◆ **Vanechoutte M., I. Tjernberg, F. Baldi, M. Pepi, R. Fani, E. R. Sullivan, J. van der Toorn and L. Dijkshoorn.** (1999). Oil-degrading *Acinetobacter* strain RAG-1 and strains described as '*Acinetobacter venetianus* sp. nov.' belong to the same genomic species. *Res. Microbiol.* 150: 69-73.
- ◆ **Vila J., A. Marcos, F. Marco, S. Abdalla, Y. Vergara, R. Reig, R. Gomes-Lus and T. Jimenez de Anta.** (1993). In vitro antimicrobial production of β -lactamases, aminoglycoside-modifying enzymes, and chloramphenicol acetyltransferase by and susceptibility of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 138-141.
- ◆ **Vila J., M. Navia, J. Ruiz, and C. Casals.** (1997). Cloning and nucleotide sequence analysis of a gene encoding an OXA-Derived β -Lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:2757-2759.
- ◆ **Vila J and F. Marco.** (2002). Lectura interpretada del antibiograma de bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 20: 304-312.
- ◆ **Villa L., C. Pezzella, F. Tosini, P. Visca, A. Petrucca and A. Carattoli.** (2000). Multiple-antibiotic resistance mediated by structurally related

Incl/mplasmids carrying an extended-spectrum β -lactamase gene and a class 1 integron. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:2911-2914

- ◆ **Wagner M., R. Erhart, W. Manz, R. Amann, H. Lemmer, D. Wedi and K.-H. Schleifer.** (1994). Development of an rRNA-target oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for in situ monitoring in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 792-800.
- ◆ **Webber M. A. and L. J. V. Piddock.** (2003). The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**: 9-11.
- ◆ **Yum J. H., K. Yi, H. Lee, J. M. Kim, G. M. Rossolini and Y. Chong.** (2002). Molecular characterization of metallo- β -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomospecies 3 from Korea: identification of two new integrons carrying the *bla(VIM-2)* gene cassettes. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**: 837-40.
- ◆ **Zgurskaya H. and H. Nikaido.** (2000). Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes. *Mol. Microbiol.* **37**: 219-225.