

## Artículo original

# Detección de carbapenemasas tipo OXA en aislados de *Acinetobacter baumannii* de diferentes centros hospitalarios de Caracas, Venezuela

Nirvia Margot Cuaical Ramos\*, Yerismar Andreina Delgado Borrero, Yelli María Anzola Anzola, Daniel Marcano Zamora, Luis Carlos Torres

Cátedra de Microbiología, Escuela de Bioanálisis, Universidad Central de Venezuela.

Recibido 6 de diciembre de 2011; aceptado 10 de mayo de 2012

**Resumen:** Cada vez es más frecuente detectar aislados nosocomiales de *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenémicos. En esta investigación se realizó la detección de carbapenemasas tipo OXA en 60 aislados de *A. baumannii* de diferentes centros de salud de Caracas. La identificación se realizó de manera convencional y por PCR, mediante la detección de  $bla_{OXA-51-like}$  como marcador de especie de *A. baumannii*. El perfil de susceptibilidad se realizó por el método de Kirby Bauer según las normas de CLSI 2009; la actividad enzimática contra los carbapenémicos se evaluó mediante pruebas microbiológicas; a través de PCR se realizó la detección molecular de  $bla_{OXA-23-like}$  y  $bla_{OXA-58-like}$ . En el 96,6% de los aislados se detectaron los genes que codifican para las carbapenemasas tipo OXA; de éstos, 93,4% presentó  $bla_{OXA-23-like}$  y 6,6%  $bla_{OXA-58-like}$ . En el 3,3% de los aislados positivos se encontró la coexistencia de  $bla_{OXA-23-like}$  y  $bla_{OXA-58-like}$ . La detección de  $bla_{OXA-23-like}$  en la mayoría de los aislados resistentes a carbapenémicos permite considerarla como un factor determinante en la resistencia a estos antimicrobianos; consecuentemente en *A. baumannii* se pueden detectar más de un gen que codifica para carbapenemasas tipo OXA, los que presenta de forma intrínseca ( $bla_{OXA-51}$ ) y los adquiridos ( $bla_{OXA-23}$  y  $bla_{OXA-58}$ ).

**Palabras clave:** *Acinetobacter*, Venezuela, resistencia, carbapenémicos.

## Detection of OXA type carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* from different hospital centers in Caracas, Venezuela

**Abstract:** It has become increasingly frequent to detect nosocomial carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. In this study we detected OXA type carbapenemases in 60 *A. baumannii* isolates from different health centers in Caracas. The identification was done in a conventional fashion and by PCR through detection of  $bla_{OXA-51-like}$  as a *A. baumannii* species marker. The susceptibility profile was done with the Kirby Bauer method according to CLSI 2009 guidelines; enzymatic activity against carbapenems was evaluated through microbiological tests; molecular detection of  $bla_{OXA-23-like}$  and  $bla_{OXA-58-like}$  was done by PCR. Genes that codify for OXA type carbapenemases were detected in 96.6% of the isolates; of these, 93.4% showed  $bla_{OXA-23-like}$  and 6.6%  $bla_{OXA-58-like}$ . In 3.3% of the positive isolates coexistence of  $bla_{OXA-23-like}$  and  $bla_{OXA-58-like}$  was detected. Detection of  $bla_{OXA-23-like}$  in most of the carbapenem resistant isolates indicates that it is a determining factor in the resistance of these antimicrobials; consequently, more than one gene codifying for OXA type carbapenemases can be detected in *A. baumannii*, the one presented intrinsically ( $bla_{OXA-51}$ ), and those which are acquired ( $bla_{OXA-23}$  and  $bla_{OXA-58}$ ).

**Keywords:** *Acinetobacter*, Venezuela, resistance, carbapenemes.

\* Correspondencia:  
E-mail: ramosnirvia@hotmail.com

### Introducción

*Acinetobacter baumannii* es un microorganismo gramnegativo no fermentador de la glucosa que en las últimas dos décadas ha escalado posiciones como un importante patógeno oportunista nosocomial, asociado a neumonía, bacteriemia, meningitis, infecciones del tracto urinario, peritonitis e infecciones de piel y tejidos blandos [1,2]. Posee una gran

variedad de mecanismos de resistencia de tipo enzimático y no enzimático que tienen acción sobre un amplio espectro de antimicrobianos que incluye a drogas tan activas como los carbapenémicos [3].

Actualmente, en *A. baumannii* los mecanismos de resistencia enzimáticos se han asociado al aumento de la resistencia a imipenem y meropenem. Entre las carbapenemasas que se han descrito en este microorganismo

se encuentran las metalobetalactamasas (IMP, VIM, SIM) [4-6], recientemente serinocarbenemasas tipo GES [7,8] y KPC [9], pero con mayor frecuencia las carbapenemasas tipo OXA [10]. Estas últimas se ubican en la clase D, según la clasificación de Ambler y 2df según la clasificación de Bush y Jacoby [11]. En *A. baumannii* se han identificado cinco grupos de betalactamasas tipo OXA, las intrínsecas como OXA-51 que permite la identificación a nivel de especie de este microorganismo [12] y las adquiridas, las cuales se han relacionado con la resistencia a carbapenémicos y se encuentran representadas por OXA-23, -40, -58 y -143 [13-15].

En algunos casos los aislados de *A. baumannii* pueden presentar secuencias de inserción (IS<sub>Aba</sub>) cerca de los genes que codifican para algunas carbapenemasas tipo OXA, potenciando la expresión de éstas y por tanto aumentando el nivel de resistencia a los carbapenémicos. Comúnmente IS<sub>Aba</sub> 1 e IS<sub>Aba</sub> 4 están asociadas a la expresión de OXA-23; IS<sub>Aba</sub> 1, IS<sub>Aba</sub> 2, IS<sub>Aba</sub> 3 e IS 18 se relacionan con OXA-58 e IS<sub>Aba</sub> 1 con OXA-51 [13,16].

A nivel mundial, la detección de este mecanismo de resistencia en *A. baumannii*, es cada vez más frecuente [17]. En Latinoamérica, países como Argentina, Bolivia, Brasil y Colombia han reportado aislados de *A. baumannii* que presentan carbapenemasas tipo OXA [18-20]. En Venezuela en el año 2009 se registró un 36,1% y 41,4% de aislados de *A. baumannii* resistentes a imipenem y meropenem respectivamente en pacientes hospitalizados [21], sin embargo aún no se han documentado brotes hospitalarios de *A. baumannii* resistentes a estos antimicrobianos por carbapenemasas tipo OXA; la presente investigación es uno de los pocos trabajos realizados en Venezuela con el fin de detectar carbapenemasas tipo OXA en aislados de *A. baumannii*.

## Materiales y métodos

**Recolección de los aislados:** Durante el período comprendido entre agosto y diciembre de 2008 se recolectaron aislados del Complejo *A. baumannii-calcoaceticus* obtenidos de muestras clínicas provenientes de seis centros hospitalarios de Caracas: Hospital Universitario de Caracas, Hospital Dr. "Domingo Luciani", Hospital Vargas de Caracas, Policlínica Metropolitana, Instituto Médico la Florida y Clínica Atías. El criterio de selección de los aislados fue susceptibilidad disminuida a imipenem o meropenem (halo  $\leq 21$  milímetros) por el método de Kirby-Bauer [22].

**Identificación fenotípica y genotípica:** Las cepas se identificaron por pruebas bioquímicas convencionales y confirmadas a nivel de especie a través de la detección de *bla*<sub>OXA-51-like</sub> por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) de punto final.

**Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana:** La susceptibilidad a los agentes antimicrobianos se determinó por el método Kirby-Bauer según las recomendaciones del Instituto de

Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) 2009 [23]. Los antimicrobianos evaluados fueron: ampicilina/sulbactam 10/10  $\mu\text{g}$ , piperacilina/ tazobactam 100/10  $\mu\text{g}$ , ceftazidima 30  $\mu\text{g}$ , cefepime 30  $\mu\text{g}$ , ciprofloxacina 5  $\mu\text{g}$ , amikacina 30  $\mu\text{g}$ , gentamicina 10  $\mu\text{g}$ , imipenem 10  $\mu\text{g}$ , meropenem 10  $\mu\text{g}$ , y doxiciclina 30  $\mu\text{g}$ . Todos los antibióticos empleados fueron de la marca "Oxoid".

**Detección fenotípica de carbapenemasas:** En todos los aislados se realizó la detección de la producción de carbapenemasas mediante el test de Hodge usando un disco de imipenem 10  $\mu\text{g}$  y una suspensión 0,5 McFarland de *Escherichia coli* ATCC 25922, como lo describe la subcomisión de antimicrobianos de la Asociación Argentina de Microbiología (SADE BAC-AAM) [22]. El control positivo empleado en esta técnica fue *Enterobacter cloacae* INH 680267 carbapenemasa positivo. La producción de carbapenemasas tipo metalobetalactama se realizó por el test de sinergia entre el disco 0,5M de ácido etilendiaminotetraacético/mercaptoacetato de sodio (EDTA/SMA) y los discos de imipenem 10  $\mu\text{g}$  y ceftazidima 30  $\mu\text{g}$  [22]. El control positivo empleado en esta técnica fue *Klebsiella pneumoniae* INH 77917 productora de VIM. Los controles fueron cedidos por el Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel".

**Detección de genes que codifican para carbapenemasas por PCR de punto final:** Las secuencias iniciadoras empleadas para la detección de los genes codificantes de

Tabla 1. Secuencias iniciadoras empleadas en este estudio.

Nombre del iniciador	Secuencia (5'-3')	Tamaño del amplificado (pb)	Ref.
OXA-51- F	TAATGCTTTGATCGGCCTTG	353	24
OXA-51- R	TGGATTGCACTTCATCTTGG		
OXA-23- F	GATCGGATTGGAGAACCA GA	501	24
OXA-23- R	ATTTCTGACCGCATTCCAT		
OXA-58- U	AGTATTGGGGCT TGTGCT	453	25
OXA-58- L	AAC TTC CGT GCC TAT TTG		
IMP-plus	AGCCTGTTCCCATGTAC	678	8
IMP-minus	GTTTTATGTGTATGCTTCC		
VIM-a	GTCTATTGACCGCGTC	775	8
VIM-b	CTACTCAACGACTGAGCG		
16S plus	AGGAGGTGATCCAACCGCA	370	26
16S minus	AACTGGAGGAAGGTGGGGAT		

las carbapenemasas investigadas se encuentran descritas en la tabla 1.

El ADN bacteriano se obtuvo mediante lisis celular por ebullición durante 15 minutos de una suspensión de dos colonias de la cepa en estudio en 100  $\mu\text{L}$  de agua calidad PCR y centrifugada posteriormente por 2 minutos a 10.000 rpm. Las reacciones de amplificación se realizaron con: 35,2  $\mu\text{L}$  de agua calidad PCR, 5  $\mu\text{L}$  de buffer taq 10X, 1,5

$\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  25 mM, 1  $\mu\text{L}$  de dNTPs 10 pmol/ $\mu\text{L}$ , 1  $\mu\text{L}$  de iniciador F 10 pmol/ $\mu\text{L}$ , 1  $\mu\text{L}$  de iniciador R 10 pmol/ $\mu\text{L}$ , 0,3  $\mu\text{L}$  de Taq polimerasa 5u/ $\mu\text{L}$  y 5  $\mu\text{L}$  de templado. Todos los reactivos empleados fueron de la marca Invitrogen®.

El termociclador (Bio- Rad) fue programado según los siguientes protocolos de trabajo: *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>OXA-23</sub> y *bla*<sub>OXA-58</sub>: 1 ciclo de desnaturalización a 94 °C por 5 minutos, 30 ciclos de: desnaturalización a 94 °C por 45 segundos, alineación a 52 °C por 1 minuto, extensión a 72 °C por 1 minuto, y un ciclo de extensión final a 72 °C por 6 minutos. *bla*<sub>IMP</sub> y *bla*<sub>VIM</sub>: 1 ciclo de desnaturalización a 95 °C por 4 minutos, 30 ciclos de: desnaturalización a 94 °C por 1 minuto, alineación a 58 °C por 30 segundos, extensión a 72 °C por 1 minuto, y un ciclo de extensión final a 72 °C por 1 minuto.

Los productos de amplificación fueron detectados en geles de agarosa 1,2% teñidos con bromuro de etidio 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . La siembra se realizó mezclando 10 $\mu\text{L}$  de los productos con 3  $\mu\text{L}$  de buffer de siembra. La corrida electroforética se realizó a 80 voltios en buffer TBE 1X durante los primeros 15 minutos, luego a 100 voltios por 45 minutos. El registro fotográfico se hizo en el equipo Gel Doc® 2000 (Bio-Rad). El marcador de peso molecular empleado fue DNA Ladder 100 pb (Axygen Biosciencias).

Se emplearon los siguientes controles positivos: *primer* universal 16S con el fin de verificar la extracción de ADN bacteriano, *Acinetobacter baumannii* INH 628161 para OXA-51, *Acinetobacter baumannii* INH 628504 para OXA-23, *Acinetobacter baumannii* INH 221781 para OXA-58, *Klebsiella pneumoniae* INH 77917 para VIM y *Pseudomonas aeruginosa* INH 77923 para IMP. Todos los controles fueron cedidos por el Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel".

## Resultados

**Recolección de los aislados:** En el período comprendido entre agosto y diciembre de 2008 se recolectaron en los centros de salud seleccionados, 60 aislados del Complejo *A. baumannii-calcoaceticus*, los cuales cumplieron con los criterios de selección.

**Identificación fenotípica y genotípica de los aislamientos:** Los 60 aislados fueron identificados por pruebas bioquímicas convencionales como Complejo *A. baumannii-calcoaceticus* y confirmadas a nivel de especie como *A. baumannii* a través de la detección de *bla*<sub>OXA-51-like</sub> por PCR de punto final (Figura 1).

**Susceptibilidad antimicrobiana:** El 95% de las cepas seleccionadas presentaron resistencia frente a imipenem y meropenem, mientras que el 5% mostró sensibilidad disminuida para estos carbapenémicos. Con respecto al resto de los antimicrobianos ensayados se observó 100% de resistencia a ciprofloxacina, 93,3% a cefepime, 81,7% a gentamicina y 76,7% a amikacina. En relación a doxiciclina se observó un alto porcentaje de susceptibilidad,

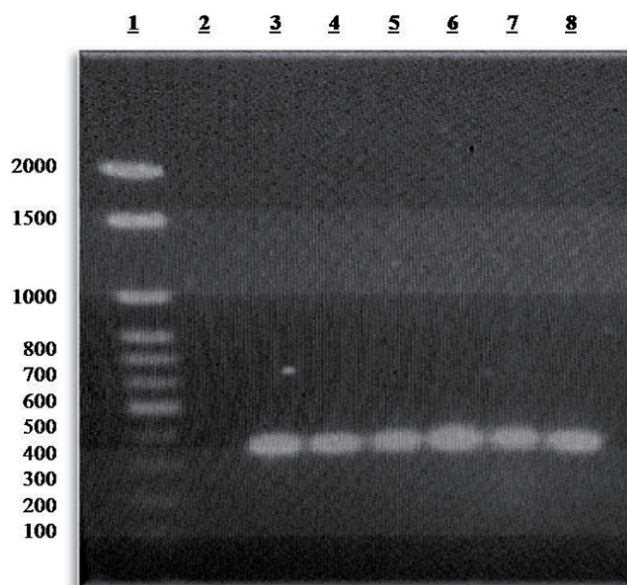


Figura 1. Detección de *bla*<sub>OXA-51-like</sub> por PCR en algunos aislados de *A. baumannii*. Corrida electroforética en gel de agarosa 1,2%. Carriles: 1) Marcador de Peso Molecular (100pb); 2) Control negativo; 3) Control OXA-51 Positivo; 4) CFAb0707; 5) CMAb0807; 6) LMAb1007; 7) LMAb1507; 8) FMAb0107.

obteniéndose sólo un 5% de cepas resistentes. En cuanto a las combinaciones de  $\beta$ -lactámicos/inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, el 100% de los aislados fueron resistentes a piperacilina/tazobactam y 31,7% a ampicilina/sulbactam.

**Detección fenotípica de carbapenemasas:** El 91,8% de los aislados de *A. baumannii* mostraron un resultado positivo en el test de Hodge. En el ensayo para la detección de metalobetalactamasas el 100% de las cepas presentaron un resultado negativo.

**Detección de los genes que codifican para carbapenemasas por PCR de punto final:** Los genes que codifican para las carbapenemasas tipo OXA se detectaron en 96,6% de los aislados (Tabla 2). En el 93,4% de los aislados se detectó *bla*<sub>OXA-23-like</sub> (Figura 2). El gen *bla*<sub>OXA-58-like</sub> se detectó en el 6,6% de los aislados, del cual un 3,3% se halló en cepas con sensibilidad disminuida a carbapenémicos y otro 3,3% en aislados con resistencia a carbapenémicos y en coexistencia con *bla*<sub>OXA-23-like</sub>. Con respecto a la detección molecular de metalobetalactamasas no se observó producto

Tabla 2. Resultados positivos de aislados de *A. baumannii* con carbapenemasas tipo OXA. Caracas, agosto-diciembre 2008.

Gen amplificado	Aislados positivos	
	Nº	%
OXA-23-like	56	93,4
OXA-58-like	4	6,6

de amplificación con los iniciadores empleados para la detección de *bla*<sub>IMP</sub> y *bla*<sub>VIM</sub>.

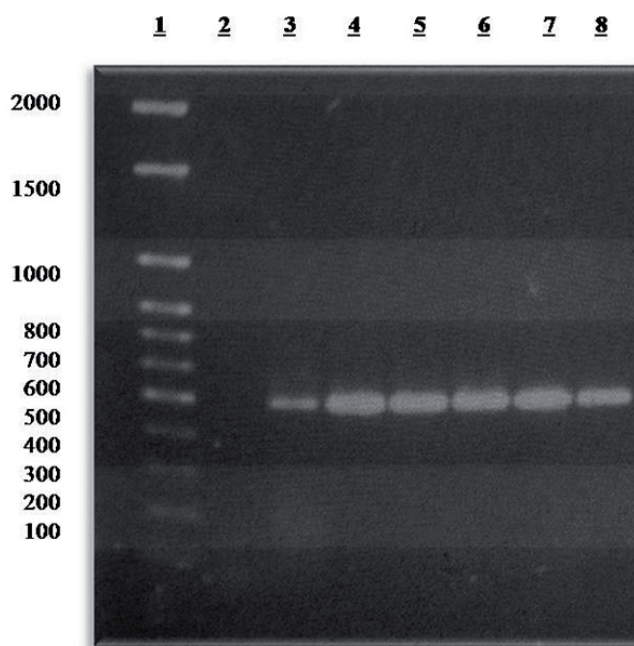


Figura 2. Detección de  $bla_{OXA-23-like}$  por PCR en algunos aislados de *A. baumannii*. Corrida electroforética en gel de agarosa 1,2%. Carriles: 1) Marcador de Alto Peso Molecular (100-2000 pb); 2) Control Negativo OXA-23; 3) Control Positivo OXA-23; 4) CFAb0807; 5) CFAb0707; 6) LFAb0107; 7) LFAb0507; 8) FMAb0107.

## Discusión

*A. baumannii* ha emergido en las últimas décadas como un potente patógeno oportunista nosocomial, caracterizándose principalmente por su alto nivel de resistencia que afecta a drogas estables y de última opción terapéutica como los carbapenémicos [2]. La identificación fenotípica en el laboratorio de este microorganismo a nivel de especie es complicada debido a que las especies que constituyen el Complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* (*A. calcoaceticus*, *Acinetobacter pittii*, genespecie 13 TU y *A. baumannii*) poseen propiedades bioquímicas similares [13]. En este estudio mediante la detección de  $bla_{OXA-51-like}$  se identificaron 60 aislados como *Acinetobacter baumannii*. Los genes que codifican para OXA-51 son intrínsecos y sólo se han detectado en esta especie, por lo que pueden ser empleados para la identificación molecular de *A. baumannii* [12,27]. Esta metodología, a diferencia de otros métodos confirmatorios, es menos costosa y laboriosa [13].

El patrón de resistencia observado en la mayoría de las cepas estudiadas, se corresponde con la capacidad de *A. baumannii* de poseer y adquirir diferentes mecanismos de resistencia contra distintas familias de antimicrobianos como aminoglucósidos, fluoroquinolonas,  $\beta$ -lactámicos/inhibidores de  $\beta$ -lactamasas y  $\beta$ -lactámicos [2].

En el test de Hodge se observó el efecto de la actividad hidrolítica de las carbapenemasas, sin embargo en un 8% de los aislados donde se obtuvo un resultado negativo, molecularmente se detectó la presencia de los genes que codifican para carbapenemasas tipo OXA. La actividad enzimática posiblemente no se observó debido a que la expresión y funcionalidad de estas enzimas podría estar

afectada por la ausencia de secuencias promotoras [28, 29].

El gen que codifica para la carbapenemasa tipo OXA-23 se detectó en el 93,4% de los aislados, esta enzima ya ha sido documentada en otros países de Suramérica como Colombia, Bolivia, Brasil y Argentina [18-20], pero en Venezuela este estudio constituye el primer reporte de carbapenemasa tipo OXA-23. Algunos trabajos como el de Orquidea y col. [28] señalan que la presencia de esta carbapenemasa contribuye de forma significativa en la resistencia a carbapenémicos en *A. baumannii*. De forma similar Naas *et al.* [30] demostraron que el 100% de los aislados de *A. baumannii* que estudiaron poseían genes que codificaban para la carbapenemasa tipo OXA-23, teniendo estos aislados la particularidad de poseer Concentraciones Inhibitorias Mínimas  $>32\mu\text{g/mL}$  para imipenem y meropenem.

En una cepa (1,6%) con sensibilidad disminuida a carbapenémicos, también se detectó  $bla_{OXA-23-like}$ . Dentro de las razones por las cuales los halos de susceptibilidad para imipenem y meropenem de este aislado hayan sido menores a los expresados típicamente por las cepas salvajes dentro de la categoría sensible, pueden encontrarse que el gen codificante para esta enzima sea afuncional o haya una baja expresión de esta carbapenemasa por la ausencia de secuencias promotoras (*ISAb1* e *ISAb4*) [29].

El gen  $bla_{OXA-58-like}$  fue detectado en dos cepas con sensibilidad disminuida a imipenem y meropenem. A diferencia de otras carbapenemasas tipo OXA, esta enzima posee una buena afinidad por el sustrato (carbapenémicos) pero débil capacidad de hidrólisis y por ende contribuiría escasamente en la resistencia a imipenem y meropenem [31], requiriendo de secuencias de inserción que contengan regiones promotoras como *ISAb1*, *ISAb2*, *ISAb4*, *IS18* para aumentar la expresión de la enzima y así generar resistencia [18]. Caso contrario ocurrió en aquellos aislados (3,3%) donde se detectó en coexistencia con  $bla_{OXA-23-like}$ , donde las cepas mostraron resistencia a los carbapenémicos, posiblemente debido a la presencia de este gen.

Además del 96,6% de cepas donde se detectó  $bla_{OXA-23-like}$  y/o  $bla_{OXA-58-like}$  se obtuvo un 3,3% de aislados donde no se encontró genotípicamente ninguna de estas carbapenemasas tipo OXA. Estos aislados presentaron resistencia (halo  $\leq 13$  mm) para imipenem y meropenem con resultados positivos en las pruebas microbiológicas. En consecuencia se puede deducir que la resistencia a carbapenems podría ser ocasionada por la existencia de otros mecanismos enzimáticos no evaluados en el presente estudio [32], sin eludir que en ambas cepas se halló  $bla_{OXA-51-like}$ . Es preciso señalar que la asociación de  $bla_{OXA-51-like}$  con secuencias promotoras *ISAb1* ocasiona un aumento en la expresión de esta enzima, convirtiendo a OXA-51 en un posible determinante de resistencia a carbapenémicos [33]. En la investigación elaborada por Lu *et al.* [34] en 28 aislados de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos, detectaron solo las secuencias *ISAb1* y  $bla_{OXA-51-like}$ . En el 86% de los aislados ellos determinaron que las secuencias *ISAb1* se encontraban corriente arriba del gen codificante para

OXA-51.

## Conclusión

El uso del punto de corte establecido por la SADEBAC-AAC en aislados de *A. baumannii* constituye una herramienta útil para la sospecha de mecanismos de resistencia a carbapenémicos. Mientras que para evidenciar la actividad carbapenemasa en este microorganismo, las pruebas microbiológicas pueden ser de utilidad.

En la mayoría de los aislados resistentes a carbapenémicos se encontró *bla*<sub>OXA-23-like</sub>, considerándose como un factor determinante en la resistencia a estos antimicrobianos. En este sentido en *A. baumannii* se puede detectar más de un gen que codifica para carbapenemasas tipo OXA, los que presenta de forma intrínseca (*bla*<sub>OXA-51-like</sub>) y aquellos que se encuentran a nivel plasmídico (*bla*<sub>OXA-23-like</sub> y *bla*<sub>OXA-58-like</sub>), los cuales facilitan la diseminación vertical y horizontal de este mecanismo de resistencia.

## Agradecimientos

Este estudio ha sido posible gracias al apoyo financiero del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) mediante el proyecto grupal N° 09.00.6795.2007. La captación de los aislados en estudio fue posible gracias a la colaboración del personal de las diferentes secciones de bacteriología, representadas por las Licenciadas Tonya Mora (Hospital Universitario de Caracas), Ninoska Montilla (Hospital Dr. "Domingo Luciani"), Mariana Morales (Hospital Vargas de Caracas), Nelly Márquez (Policlínica Metropolitana), Mirna Torres (Instituto Médico la Florida) y Marisela Domínguez (Clínica Atías). Estos agradecimientos también se extienden al personal docente y técnico de la Cátedra de Microbiología de la Escuela de Bioanálisis de la Universidad Central de Venezuela por su apoyo técnico y logístico durante la realización de este estudio.

## Referencias

1. Diomedí A. Infecciones por *Acinetobacter baumannii* pan-resistente. Consideraciones epidemiológicas y de manejo antimicrobiano actualizado. Rev Chil Infect. 2005; 22:298-320.
2. Chun-Ming L, Hwee-Kheng L, Chang-Pan L, Hsiang-Kuang T. Treatment of pan-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. Scand J Infect Dis. 2005; 37:195-9.
3. Héritier C, Poirel L, Lambert T, Nordmann P. Contribution of acquires carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49:3198-202.
4. Torres L, Salazar M, Moran A, González A, Sanoja L, Calvo A y col. Resistencia a carbapenems mediada por metalobetalactamasas en bacilos gramnegativos aislados de ambientes hospitalarios. Act Cient de la Soc Venez de Bioanal Espec 2006; 9:3-10.
5. Wang H, Guo P, Sun H, Wang H, Yang Q, Chen M et al. Molecular epidemiology of clinical isolates of carbapenem

resistant *Acinetobacter* spp. from Chinese hospitals. Antimicrob Agents Chemother. 2007; 51:4022-8.

6. Lee K, Yum J, Yong D, Lee H, Kim H, Docquier J et al. Novel acquired metallo-β-lactamase gene, *bla*<sub>SIM-17</sub> in a class I integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49:4485-91.
7. Moubareck C, Bre'mont S, Conroy MC, Courvalin P, Lambert T. GES-11, a novel integron-associated GES variant in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53: 3579-81.
8. Bogaerts P, Naas T, El Garch F, Cuzon G, Deplano A, Delaire T et al. GES extend-spectrum β-lactamases in *Acinetobacter baumannii* isolates in Belgium. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54:4872-8.
9. Robledo I, Aquino E, Santé M, Santana J, Otero D, León C et al. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54:1354-7.
10. Afzal-Shah M, Woodford N, Livermore D. Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D β-Lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45:583-8.
11. Bush K, Jacoby G. Updated functional classification of β-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54:969-76.
12. Turton J, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann M, Pitt T. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the *bla*<sub>OXA-51-like</sub> carbapenemase gene intrinsic to this species. J Clin Microbiol. 2006; 44: 2974-6.
13. Peleg A, Seifert H, Paterson D. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev. 2008; 21:538-82.
14. Walther-Rasmussen J, Haiby N. OXA-type carbapenemas. J Antimicrob Chemother. 2006; 57:373-83.
15. Higgins P, Poirel L, Lehmann M, Nordmann P, Seifert H. OXA-143, a novel carbapenem- hydrolyzing class D beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53:2035-8.
16. Bou G, Martínez J. Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC β-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2000; 44:428-32.
17. Gallego L, Canduela M, Pujana I, Calvo F, Umanan A, Martín G. Detección de carbapenemasas en clones de *Acinetobacter baumannii* resistentes a imipenem. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2004; 22:262-6.
18. Merckier A, Catalano M, Ramirez M, Quiroga C, Orman B, Ratier L et al. Polyclonal spread of *bla*<sub>OXA-23</sub> and *bla*<sub>OXA-58</sub> in *Acinetobacter baumannii* isolates from Argentina. J Infect Developing Countries. 2008; 2: 235-40.
19. Fernández E, Bustamante Z, Zamora J, Zabalaga S, Pinto J, Funes F y col. Determinación de carbapenemasas y su relación con estructuras genéticas en aislamientos clínico de *Acinetobacter baumannii* de hospitales de la ciudad de Cochabamba. Biofarbo 2009; 17: 30-8.
20. Villegas MV, Kattan J, Correa A, Lolans K, Guzman A, Woodford N et al. Dissemination of *Acinetobacter baumannii* with OXA-23 carbapenemase in Colombian hospitals. Antimicrob Agents Chemother. 2007; 51: 2001-4.
21. Red de Sociedades Científicas Médicas de Venezuela. Nota técnica Número 38: Resistencia bacteriana a los antibióticos. La epidemia silenciosa. Disponible en: [http://www.rscmv.org.ve/pdf/nota\\_tecnica38.pdf](http://www.rscmv.org.ve/pdf/nota_tecnica38.pdf). Acceso 07 de abril, 2012.

22. Asociación Argentina de Microbiología. Caracterización de la resistencia a betalactámicos en *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter spp.* Disponible en: [http://www.aam.org.ar/vermas\\_publicaciones.asp?9](http://www.aam.org.ar/vermas_publicaciones.asp?9). Acceso 01 de septiembre, 2008.
23. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; nineteenth informational supplement. M100-S19. Wayne (PA), USA: 2009.
24. Woodford N, Ellington M, Coelho J, Turton J, Ward M, Brown S *et al.* Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter spp.* Int J Antimicrob Agents. 2006; 27:351-3.
25. Salazar E, Nieves B, Ruiz M, Ruíz J, Vila J, Araque M *et al.* Molecular epidemiology and characterization of resistance mechanisms to various antimicrobial agents in *Acinetobacter baumannii* isolated in Mérida, Venezuela. Med Sci Monit. 2007; 13:89-94.
26. Greisen K, Loeffelholz M, Purohit A, Leong D. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol. 1994; 32:335-351.
27. Brown S, Young H, Amyes S. Characterization of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina. Clin Microbiol Infect. 2005; 11:15-23.
28. Orquídea J, Montilla R, Valenzuela E, Fernández F, Álvarez C, Osorio E. Caracterización molecular de aislamientos de *Acinetobacter baumannii* provenientes de la unidad de quemados de un hospital de tercer nivel de Bogotá. Infectio. 2006; 10:71-8.
29. Crouve S, Poirel L, Naas T, Drugeon H, Nordmann P. Genetics and expression of the carbapenems-hydrolyzing oxazillinase gene *bla*<sub>OXA-23</sub> in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2007; 51:1530-3.
30. Naas T, Levy M, Hirschauer C, Marchandin H, Nordmann P. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-23 in a tertiary care hospital of Papeete, French Polynesia. J Clin Microbiol. 2005; 43:4826-9.
31. Poirel L, Marqué S, Héritier C, Segonds C, Chabanon G, Nordmann P. OXA-58, a novel class D  $\beta$ -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49:202-8.
32. Livermore D, Woodford N. The  $\beta$ -lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. Trends Microbiol. 2006; 14:413-8.
33. Turton J, Ward M, Woodford N, Kuafman M, Pike R, Livermore D *et al.* The role ISAbal in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. FEMS Microbiol Lett. 2006; 258:72-7.
34. Lu P, Huang L, Lian S, Chang K, Lin C, Hwang I *et al.* How carbapenem-resistant *Acinetobacter spp.* established in a newly constructed hospital. Int J Antimicrob Agents. 2008; 31:463-6.