Detección de carbapenemasas en clones de *Acinetobacter baumannii* resistentes a imipenem

Lucía Gallego[a], Miren Josune Canduela[a], Elena Sevillano[a], Idoia Pujana[a], Felícitas Calvo[b], Adelaida Umaran[a] y Gloria Martín[c]

[a]Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina y Odontología. Universidad del País Vasco. Bilbao. Vizcaya. España. [b]Servicio de Microbiología. Hospital de Santa Marina. Vizcaya. [c]Servicio de Microbiología. Hospital de San Eloy. Vizcaya. España.

INTRODUCCIÓN. El objetivo del trabajo fue la detección de carbapenemasas en aislamientos de *Acinetobacter baumannii* resistentes a imipenem recogidos durante 19 meses en un hospital del Servicio de Salud del País Vasco y la caracterización genética de los clones implicados.

MÉTODOS. La sensibilidad a imipenem, meropenem, ticarcilina, ceftazidima, cefotaxima, cefepima y aztreonam se realizó determinando la concentración inhibitoria mínima (CIM) mediante la técnica de dilución en agar. Los aislamientos se caracterizaron genéticamente mediante la técnica de ácido ribonucleico de transferencia (ARNt) y tipificados mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los iniciadores ERIC2, AP3 y M13. La detección de carbapenemasas se realizó utilizando la técnica de Hodge y la detección de metalobetalactamasas mediante un ensayo de inhibición con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y mediante la tira comercial Etest MBL.

RESULTADOS. Fueron resistentes a imipenem 76 aislamientos y, de ellos, 49 lo eran a todos los betalactámicos ensayados. Las técnicas de tipificación genética mostraron la presencia de tres genotipos predominantes denominados I (9 aislamientos), II (48 aislamientos) y III (8 aislamientos). El test de Hodge mostró positividad en 45 cepas del genotipo II, 8 del I y 7 del III. El test de EDTA resultó positivo en 8 aislamientos del genotipo II, 4 del I, y 3 del III. Mediante Etest, 7 cepas mostraron resultado positivo (45% de los casos positivos por el ensayo con EDTA).

CONCLUSIÓN. Teniendo en cuenta nuestros resultados puede establecerse que uno de los factores que explican el elevado grado de resistencia a imipenem en los aislamientos analizados, se debe a la diseminación de un clon mayoritario multirresistente que produce carbapenamasas de tipo OXA en el que también se ha detectado actividad metalobetalactamasa.

***Palabras clave: A. baumannii*. Imipenem. PCR. Carbapenemasa. Metalobetalactamasa.**

Carbapenemase detection in *Acinetobacter baumannii* clones resistant to imipenem

INTRODUCTION. The aim of this study was to detect carbapenemases in imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates obtained in the microbiology department of a Basque Country Public Health Service hospital over a period of 19 months, and to genetically characterize the resistant clones.

METHODS. Susceptibility tests to imipenem, meropenem, ticarcillin, ceftazidime, cefotaxime, cefepime and aztreonam were done by determining the minimum inhibitory concentration on agar plates. A tRNA technique was used for species identification and PCR with primers ERIC2, AP3 and M13 for genetic typing of resistant isolates. Carbapenemase production was detected by the Hodge test and metallo-beta-lactamase by the EDTA test and Etest MBL.

RESULTS. A total of 76 isolates were resistant to imipenem and 49 of these were resistant to all the betalactam antibiotics tested. Genetic typing showed three predominant clones, denominated I (9 isolates), II (48 isolates) and III (8 isolates). Hodge and EDTA tests were positive in 45 and 8 isolates belonging to clone II, 8 and 4 belonging to clone I and 7 and 3 belonging to clone III, respectively. The Etest confirmed 7 results (45% of the 17 positive EDTA test isolates).

CONCLUSION. Our results show that one factor contributing to the high level of imipenem resistance in the isolates analyzed is dissemination of a predominant, multiresistant clone able to produce OXA-type carbapenemases and metallo-beta-lactamases.

***Key words: A. baumannii*. Imipenem. PCR. Carbapenemase. Metallo-beta-lactamase.**

Introducción

Acinetobacter baumannii está considerado hoy en día como un patógeno emergente, ya que se ha incrementado de forma alarmante el número de aislamientos

Correspondencia: Dra. L. Gallego.
Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología.
Facultad de Medicina y Odontología. Universidad del País Vasco.
Apdo. 699. 48080 Bilbao. Vizcaya. España.
Correo electrónico: oipgaanl@lg.ehu.es

Manuscrito recibido el 26-8-2003; aceptado el 22-10-2003.

Este trabajo ha sido posible gracias a un proyecto de la Universidad del País Vasco (1UPV 00093.327-E-13711/2001).

00

responsables de infecciones nosocomiales graves. Muchos de estos aislamientos hospitalarios son además multirresistentes, lo que complica enormemente el tratamiento y empeora el pronóstico del paciente infectado por estos aislamientos.

Los carbapenems siguen siendo considerados uno de los tratamientos antibióticos más eficaces frente a las infecciones por *Acinetobacter* spp., aunque cada vez es más frecuente la descripción de cepas resistentes[1-3]. A pesar de que estas cepas se han aislado de diferentes áreas geográficas en todo el mundo, en Europa parece ser un fenómeno epidémico en el norte, pero endémico en algunos países del área mediterránea[2,4-6]. Aunque pueden estar implicados mecanismos de resistencia como la alteración en las proteínas de unión a penicilinas (PBP) o en las proteínas de la membrana externa, en los últimos años está aumentando la descripción de cepas que producen carbapenemasas, siendo éste uno de los mecanismos más estudiados[7]. La mayoría de estas enzimas descritas hasta el momento pertenecen a la clase molecular D del tipo OXA[4,8-10], pero también se han identificado metalobetalactamasas del tipo IMP o VIM[11,12].

El objetivo del presente estudio fue detectar la presencia de carbapenemasas en la población de *A. baumannii* resistente a imipenem aislados en un hospital del Servicio de Salud del País Vasco (Osakidetza) y la caracterización genética de los clones implicados.

Métodos

Se analizaron un total de 125 aislamientos recogidos en el Servicio de Microbiología del Hospital de Santa Marina (Vizcaya) durante un período de 19 meses (desde junio de 1998 a diciembre de 1999). Este hospital es de estancia media-larga con capacidad de 240 camas en el que se tratan principalmente pacientes con enfermedades pulmonares crónicas (EPOC) y también pacientes de medicina interna, rehabilitación, cuidados paliativos y cardiología, procedentes en su mayoría de otros hospitales de mayor tamaño del área metropolitana de Bilbao. Las muestras procedían de un total de 84 pacientes y correspondían a 94 esputos, 7 muestras de orina, 8 hemocultivos, 1 aspirado pleural, 12 escaras y 3 punciones transtorácicas.

Como cepas control se utilizaron las siguientes: para la técnica de ácido ribonucleico de transferencia (ARNt) se utilizó una cepa de *Acinetobacter* genoespecie 2 (cedida por el Dr. Kevin J. Towner, Nottingham, Reino Unido), para la determinación de la sensibilidad antibiótica la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y para el estudio de carbapenemasas la cepa de *Escherichia coli* CECT 434, *P. aeruginosa* A327 (IMP-1) y *A. baumannii* SM 80 (OXA-40).

Caracterización a nivel de especie mediante la técnica de ARNt: los aislamientos, identificados en el hospital mediante el sistema API20NE o ID32GN (BioMérieux), fueron analizados genéticamente mediante la técnica de ARNt utilizando experimentos de amplificación de ADN (reacción en cadena de la polimerasa, PCR) con los iniciadores T3A (5'-GGGGGTTCGAATTCCCGCCGGCCCCA-3') y T5B (5'-AATGCTCTACCAACTGAACT-3') en las condiciones descritas previamente[13].

Determinación de la sensibilidad antibiótica: el estudio de la sensibilidad antibiótica se realizó mediante la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) por la técnica de dilución en agar siguiendo las indicaciones del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)[14]. Los antibióticos ensayados fueron los siguientes: ticarcilina, cefotaxima, ceftazidima, cefepima, imipenem, meropenem y aztreonam.

Respecto a la tipificación genética, la identificación a nivel de clon se realizó utilizando la técnica de PCR llevando a cabo reacciones por triplicado con los iniciadores ERIC2 (5'-AAGTAAGTACCTGGGGTGAGCG-3'), AP3 (5'-TCACGATGCA-3') y M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3') en las condiciones descritas previamente[3,15]. Los ciclos de amplificación fueron los siguientes: AP3: 1x (5 min a 94 °C, 5 min a 35 °C y 5 min a 72 °C), 28x (1 min a 94 °C, 2 min a 35 °C y 2 min a 72 °C) y 1x (10 min a 72 °C); ERIC2: 1x (5 min a 94 °C, 5 min a 35 °C y 5 min a 72 °C), 28x (1 min a 94 °C, 2 min a 52 °C y 2 min a 72 °C) y 1x (10 min a 72 °C) y M13: 1x (2 min a 94 °C), 35x (20 seg a 94 °C, 1 min a 50 °C y 20 seg a 72 °C) y 1x (5 min a 72 °C).

El análisis de los resultados se realizó mediante el programa Molecular Analyst/Macintosh Fingerprinting 1.0 (Bio-Rad). Siguiendo las recomendaciones del Grupo Europeo de Marcadores Epidemiológicos y las indicaciones de grupos internacionales de referencia[15,16] los aislamientos que se agruparon con un valor de Sab > 0,72 se consideraron del mismo clon.

Detección fenotípica de carbapenemasas: todos los aislamientos resistentes a imipenem se analizaron mediante la técnica de Hodge para la detección de carbapenemasas y las pruebas de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) siguiendo la metodología descrita previamente[17] y Etest MBL para la detección de metalobetalactamasas, siguiendo las indicaciones del fabricante (AB Biodisk, Suecia).

Para la técnica de Hodge se inoculó la superficie de una placa de agar con la cepa de *E. coli* CECT 434 sensible a imipenem, se colocó un disco de imipenem (10 μg) (Mast Diagnostics, UK) en el centro y se inocularon radialmente las cepas que se iban a ensayar. Tras incubación se comprobó la existencia de una distorsión en intersección entre la zona de inhibición de la cepa control alrededor del disco de imipenem y la cepa problema.

La técnica de EDTA se realizó inoculando una placa de agar con 100 μl de un cultivo en caldo de la cepa de *Acinetobacter* con una turbidez de 0,5 U de la escala McFarland y colocando un disco de imipenem (10 μg) y otro de EDTA (1,5 mg/disco) a una distancia de 10 mm. La presencia de una metalobetalactamasa se evidenció por la presencia de una distorsión (aumento) en el halo de inhibición alrededor del disco de imipenem. Cuando el resultado era dudoso se utilizó otra variante que consistía en añadir la solución de EDTA directamente sobre el disco de imipenem (IMP + EDTA), colocando además en la placa dos discos control, uno de imipenem (IMP) y otro de EDTA. En este caso, un resultado positivo se demostraba por un aumento del halo de inhibición de IMP + EDTA con respecto al de IMP.

La técnica de Etest MBL se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante (AB Biodisk). La presencia de betalactamasas se detectó por la aparición de un halo de mayor tamaño en la zona de imipenem más EDTA.

Detección genotípica de la nueva carbapenemasa OXA-40: la detección genética de la presencia del gen bla_{OXA-40} se realizó mediante amplificación por PCR con los iniciadores OXA24-R y OXA-24F, siguiendo las condiciones descritas previamente[4,8].

Resultados

El análisis de los resultados de sensibilidad antibiótica mostró que 72 aislamientos eran resistentes a meropenem (57,6% de la población total), 76 a imipenem (60,8%), 76 a ticarcilina (60,8%), 88 a ceftazidima (70,4%), 92 a cefepima (73,5%), 97 a aztreonam (78,1%) y 102 a cefotaxima (81,6%). Si a estos porcentajes se le sumaban los aislamientos con nivel intermedio los porcentajes eran los siguientes: 60,8% a meropenem, 66,4% a imipenem, 79,8% a ceftazidima, 85,4% a cefepima, 87% a ticarcilina, 87,5% a aztreonam y 91,8% a cefotaxima.

En cuanto a la resistencia combinada se comprobó que: *a)* algunas cepas resistentes a imipenem eran intermedias o sensibles a meropenem; *b)* de los 76 aislamientos resistentes a imipenem, también lo eran a un mínimo de otros dos betalactámicos ensayados, y *c)* 49 fueron

TABLA 1. **Resistencia a los antibióticos betalactámicos de los 76 aislamientos de *Acinetobacter baumannii* resistentes a imipenem**

Antibiótico	Cepas sensibles (nº [%])	Cepas intermedias (nº [%])	Cepas resistentes (nº [%])
Ticarcilina	5 (6,58)	13 (17,11)	58 (76,32)
Ceftazidima	6 (7,89)	5 (6,58)	65 (85,53)
Cefotaxima	4 (5,26)	2 (2,63)	70 (92,11)
Cefepima	9 (11,84)	3 (3,95)	64 (84,21)
Meropenem	14 (18,42)	3 (3,95)	59 (77,63)
Aztreonam	2 (2,63)	8 (10,53)	66 (86,84)

resistentes a todos los betalactámicos estudiados, lo que representa un 64,5% de los aislamientos resistentes a imipenem y un 39% de la población total (tabla 1).

Para llevar a cabo el análisis genético de la población resistente se comenzó por confirmar la identidad de especie realizando la técnica de ARNt con la que se comprobó que las 76 cepas seleccionadas eran efectivamente *A. baumannii*.

El análisis de los perfiles obtenidos permitió identificar 11 clones distintos con el iniciador ERIC2 y 9 con AP3 y M13 (fig. 1). Sin embargo, con los tres iniciadores existió coincidencia en cuanto a que tres fueron los clones predominantes. El clon I incluía 9 aislamientos (11,8%), el clon II, 48 aislamientos (63,1%) y el clon III, 8 aislamientos (10,5%). El clon IV contaba con 4 aislamientos y todos los demás con uno o dos.

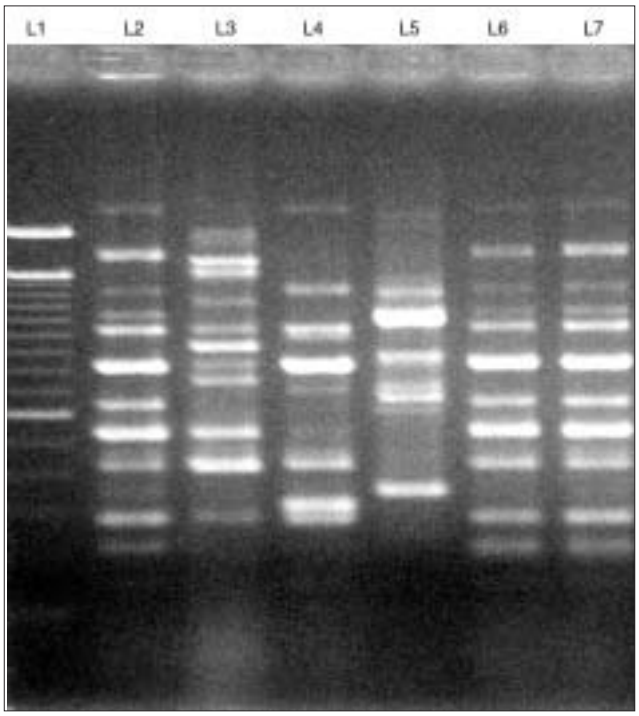

Figura 1. Perfiles de bandas característicos de los clones mayoritarios mediante el uso del iniciador M13. L1: marcador de peso molecular (100 bp ladder, Invitrogen); L2, L6 y L7: clon I; L3: clon II; L4: clon III y L5: clon IV.

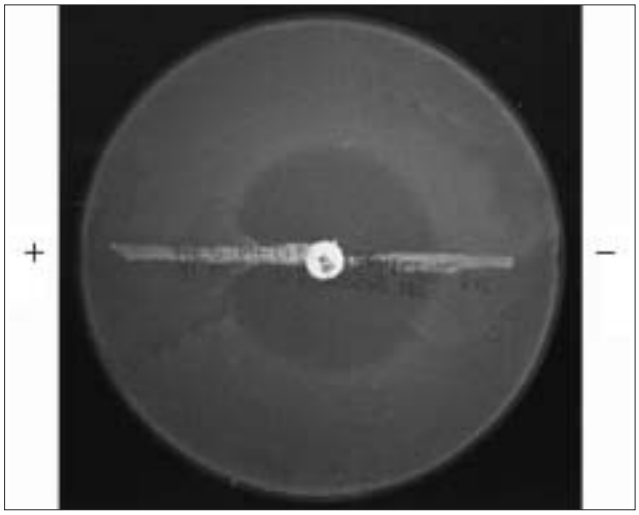

Figura 2. Test de Hodge: resultado positivo y negativo.

Teniendo en cuenta también la resistencia a meropenem pudimos comprobar que en el clon I, 2 aislamientos eran resistentes; en el clon II, 43 resistentes y uno con sensibilidad intermedia y en el clon III, seis eran resistentes.

En cuanto a la persistencia de los clones en cada paciente se analizaron los pacientes con más de un aislamiento (una media de 3 aislamientos) comprobando que en la mayoría de los casos el clon aislado era el II que se mantenía en todos los aislamientos del paciente. Otros 2 pacientes mantenían el I y el III, respectivamente, y en un caso se pudieron aislar los tres clones predominantes en aislamientos sucesivos.

En el análisis de la resistencia dentro de cada clon pudimos comprobar que eran resistentes a todos los betalactámicos ensayados, 35 aislamientos del clon II (73%), dos del clon I (6%), cinco del clon III (45%) y cuatro del clon IV (100%).

Los resultados del análisis de la presencia de carbapenemasas por el test de Hodge (fig. 2) mostraron resultado positivo en 8 cepas del genotipo I, en 45 del II, y en siete del III. Todos los genotipos minoritarios, con excepción del clon VIII también mostraron un resultado positivo.

El ensayo con EDTA para la detección de metalobetalactamasas fue positivo en 4 aislamientos del genotipo I, en ocho del II y en tres del III. También los genotipos V, VI y VIII mostraron positividad.

Los aislamientos positivos con la prueba con EDTA se analizaron con el test comercial Etest MBL. De los aislamientos del genotipo I uno fue positivo, cuatro del II, dos del III y uno del genotipo VI. Ocho cepas que habían resultado positivas con el test de EDTA fueron negativas mediante esta prueba (54%).

La relación del fenotipo a imipenem y meropenem y el resultado de los tests de carbapenemasas y metalobetalactamasas se esquematizan en la tabla 2.

La presencia del gen $bla_{\text{OXA-40}}$ se detectó en 2 aislamientos del clon I, en todos los aislamientos del clon II, en dos del clon III y en algún aislamiento de los clones minoritarios.

TABLA 2. **Resultados de los tests de Hodge, EDTA y Etest MBL en relación al fenotipo mostrado frente a imipenem y meropenem**

Clon (n.º de aislamientos)	Fenotipo (n.º de aislamientos)	Carbapenemasas	Metalobetalactamasas	
		Test de Hodge	Test EDTA	Etest MBL
I (32)	IMPrMERr (2)	1	–	–
	IMPrMERs (7)	7	4	1
II (51)	IMPrMERr (43)	40	7	4
	IMPrMERs (4)	4	–	–
	IMPrMERi (2)	1	1	–
III (11)	IMPrMERr (6)	5	2	1
	IMPrMERs (2)	2	1	1
IV (4)	IMPrMERr (4)	4	–	–

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético; IMP: imipenem; MER: meropenem.

Discusión

El aislamiento de cepas de *A. baumannii* resistentes a imipenem es cada vez más frecuente, sobre todo en países del sur de Europa[4,5,7,11]. El porcentaje global de resistencia encontrado en nuestro estudio mostró que meropenem era el antibiótico betalactámico más activo seguido de imipenem y ticarcilina. En cuanto al resto de antibióticos analizados cefotaxima fue el menos activo seguido de aztreonam, cefepima y ceftazidima. Estudios realizados en nuestro país, en los que también se analiza la población de *A. baumannii* de un hospital, coinciden en cuanto a la alta resistencia a los betalactámicos ensayados, que es incluso más elevada en el caso de imipenem[18]. Los datos del Grupo Español de Infección Hospitalaria (GEIH) muestran también a imipenem y meropenem como unos de los fármacos más eficaces, aunque con cifras globales de resistencia ligeramente inferiores. Este hecho se explica por la variabilidad de resultados encontrada por el GEIH dependiendo de los hospitales, y por el tipo y número de muestras analizadas[6].

Los iniciadores que mostraron perfiles de bandas más claros y de fácil interpretación fueron ERIC2 y M13. Dos aislamientos de los genotipos mayoritarios que eran indistinguibles con M13 sí mostraron diferencias con ERIC2. La elección de secuencias iniciadoras para esta técnica suscita normalmente debate ya que pueden hacer variar de forma importante el resultado[16]. Algunos trabajos sugieren otras secuencias útiles en *A. baumannii* como puede ser DAF4, REP o combinaciones de varios iniciadores[1,15]. En nuestro caso los resultados obtenidos han mostrado a M13 como el iniciador más recomendable, ya que además los ciclos de amplificación son mucho más cortos con lo que se tarda menos tiempo en la obtención del resultado. A pesar de todo, y para evitar errores en la identificación de clones, siempre se incluían en cada experimento de amplificación un aislamiento de los clones mayoritarios I, II y III.

El clon II resultó ser mayoritario siendo el 63,1% de la población resistente. Este hecho concuerda con la teoría de otros autores que señalan que el aumento de la resistencia se debe a la diseminación de un número limitado de clones[1,15,19,20].

La descripción de nuevas carbapenemasas es cada día más frecuente y, en la actualidad, es uno de los mecanismos emergentes considerado responsable del aumento de la resistencia a imipenem y también a meropenem[7]. Este hecho hace necesario el desarrollo de técnicas rápidas y específicas para lograr la identificación de estas enzimas.

Todas las técnicas utilizadas fueron fáciles de realizar y excepto la técnica comercial de Etest el coste de la prueba fue muy bajo. El test de Hodge en general ofreció resultados claros y fácilmente interpretables. Sin embargo, en algunos casos la interpretación del resultado de los tests de EDTA y también Etest fue un poco complicada y no pudo ser valorada de forma conveniente. En el caso del test de EDTA hay que añadir que el hecho de que variaciones en la preparación del disco o distancia entre los discos en la placa variaban de forma importante el resultado. Este hecho también pudiera ser explicado por el hecho de que la solución de EDTA pueda interferir en el crecimiento de las cepas y esto distorsionaría el resultado. Es por esta razón por lo que resultó mucho más eficaz la utilización de la segunda alternativa del método utilizando tres discos, uno de imipenem, otro de EDTA y un tercero de imipenem más EDTA.

El hecho de que no todos los resultados por la técnica de EDTA fueran confirmados por la técnica de Etest hace necesaria la utilización de técnicas confirmatorias para comprobar la presencia de falsos positivos o negativos. A pesar de la utilidad de los tests fenotípicos descritos como técnica de uso rápido en el laboratorio, los resultados de este estudio indican y apoyan la sugerencia de otros autores con respecto a la necesidad de realizar también tests de identificación genética para la caracterización específica de nuevas carbapenemasas no sólo del tipo OXA, sino nuevas metalobetalactamasas tipo IMP o VIM[7]. De hecho, en los aislamientos del clon II se encuentra ampliamente diseminada la nueva enzima OXA-40, originariamente identificada en una cepa de este clon[4].

El número de cepas con actividad metalobetalactamasa fue elevado en los clones II y III. Estudios preliminares indican la presencia de genes bla_{VIM}, pero no bla_{IMP} en estos mismos aislamientos (datos no mostrados). Este hecho concuerda con resultados descritos por otros autores que comienzan a constatar la aparición de este tipo de enzimas en países del sur de Europa[11].

Aunque otros mecanismos pueden estar implicados, está claro que el nivel de resistencia a imipenem en los aislamientos analizados se debe a la diseminación de un clon mayoritario que produce carbapenamasas tipo OXA.

Además de la presencia elevada de este tipo de enzimas también se ha constatado la presencia, aunque en menor proporción, de metalobetalactamasas. Este hecho indica la necesidad de un riguroso control de estos aislamientos para evitar su diseminación en el ambiente hospitalario y crear un grave problema de resistencia al tratamiento.

Agradecimientos

Agradecemos la ayuda prestada por Mercedes Blanco e Itziar Llona del Servicio de Microbiología; al Dr. Nicolás Guerra, Director Médico del Hospital de Santa Marina por su inestimable colaboración y al Dr Kevin J. Towner (Nottingham Reino Unido), asesor científico de nuestro grupo de trabajo. También agradecemos a las compañías que amablemente nos han suministrado los antibióticos usados en este estudio (Merck Sharp & Dohme, AstraZeneca, Bristol Myers Squibb S.A y Hoechst Marion Roussel).

Bibliografía

1. Corbella X, Montero A, Pujol M, Domínguez MA, Ayats J, Argerich MJ, et al. Emergence and rapid spread of carbapenem resistance during a large and sustained hospital outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol 2000;38:4086-95.
2. Henwood CJ, Gatward T, Warner M, James D, Stockdale MW, Spencer RP, et al. Antibiotic resistance among clinical isolates of *Acinetobacter* in the UK, and in vitro evaluation of tigecycline (GAR-936). J Antimicrob Chemother 2002;49:479-87.
3. Gallego L, Towner KJ. Carriage of class 1 integrons and antibiotic resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from Northern Spain. J Med Microbiol 2001;50:71-7.
4. López-Otsoa F, Gallego L, Towner KJ, Tysall L, Woodford N, Livermore DM. Endemic carbapenem resistance associated with OXA-40 carbapenemase among *Acinetobacter baumannii* isolates from a Hospital in Northern Spain. J Clin Microbiol 2002;40:4741-3.
5. Cornaglia G, Riccio ML, Mazzariol A. Appearance of IMP 1 metallo enzymes in Europe. Lancet 1999;353:899-900.
6. Fernández-Cuenca F, Pascual A, Vila J, Bou G, Cisneros JM, Rodríguez-Baño J, et al. Proyecto GEIH-Ab 2001: Sensibilidad de *Acinetobacter* spp. aislados en hospitales españoles a los antimicrobianos. Enferm Infecc Microbiol Clin 2002;20(Supl 1):122.
7. Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. Clin Microbiol and Infect 2002;8:321-31.
8. Bou G, Oliver A, Martínez-Beltrán J. OXA-24, a novel class D β-lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. Antimicrob Agents Chemother 2000;44:1556-61.
9. Afzal-Shah M, Woodford N, Livermore DM. 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.
10. Donald HM, Scaife W, Amyes SGB, Young H-K. Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA β -lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. Antimicrob Agents Chemother 2000;44:196-9.
11. Da Silva GJ, Correia M, Vital C, Ribeiro G, Sousa JC, Leitao R, et al. Molecular characterization of bla_{IMP-5}, a new integron-borne metallo-β-lactamase gene from an *A. baumannii* nosocomial isolate in Portugal. FEMS Microbiol 2002;215:33-9.
12. Riccio ML, Franceschini N, Boschi L, Caravelli B, Cornaglia G, Fontana R, et al. Characterization of the Metallo-β -lactamasase Determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 Reveals the Existence of *bla*IMP Allelic Variants Carried by Gene Cassettes of Different Phylogeny. Antimicrob Agents Chemother 2000;44:1229-35.
13. Ehrenstein B, Bernards AT, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Towner KJ, Bouvet JM, et al. *Acinetobacter* species identification by using tRNA spacer fingerprinting. J Clin Microbiol 1996;34:2414-20.
14. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Fifth Edition. NCCLS Document M7 2000;940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne Pennsylvania 19087-1898 USA.
15. Webster CA, Crowe M, Humphreys H, Towner KJ. Surveillance of an adult intensive care unit for long-term persistence of a multi-resistant strain of *Acinetobacter baumannii*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1998;17:171-6.
16. Grundmann HJ, Towner KJ, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Maher M, Seifert H, et al. Multicenter study using standardized protocols and reagents for evaluation of reproducibility of PCR-based fingerprinting of *Acinetobacte*r spp. J Clin Microbiol 1997;35:3071-7.
17. Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-betalactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. Clin Microbiol Infect 2001;7:88-91.
18. Ruiz J, Núñez ML, Pérez J, Simarro E, Martínez-Campos L, Gómez J. Evolution of resistance among clinical isolates of *Acinetobacter* over a 6-year period. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1999;18:292-5.
19. Bou G, Cerveró G, Domínguez MA, Quereda C, Martínez-Beltrán J. PCR-based DNA fingerprinting (REP-PCR, AP-PCR) and pulsed-field gel electrophoresis characterization of a nosocomial outbreak caused by imipenem and meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. Clin Microbiol and Infect 2000;6:635-43.
20. Bou G, Cerveró G, Domínguez MA, Quereda C, Martínez-Beltrán J. Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: High-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of β-lactamases. J Clin Microbiol 2000;38:3299-305.