

Determinación de carbapenemasas y su relación con estructuras genéticas en aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii* de hospitales de la ciudad de Cochabamba

Determining carbapenemases and its relationship to genetic structures in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* at hospitals in the city of Cochabamba

Elena Fernández Colón², Zulema Bustamante García¹, Jenny Zamora Balderrama¹, Silvia Zabalaga Via¹, Jenny Pinto Davalos¹, Fátima Funes Espinoza¹, Elena Sevillano Peña², Adelaida Umaran Sánchez², Lucía Gallego Andrés²

¹Facultad de Bioquímica y Farmacia. Universidad de San Simón. Cochabamba, Bolivia.

²Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco, Bilbao. Vizcaya, España.

Dirección para correspondencia: Elena Fernández Colón. Facultad de Bioquímica y Farmacia. Universidad de San Simón. Avenida Aniceto Arce s/n. Cochabamba, Bolivia
E mail: bioelen@yahoo.es

Recibido para publicación en 15/06/09

Aceptado en 06/10/09

RESUMEN

En este estudio se analizaron un total de 34 aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii* con el fin de determinar la presencia de carbapenemasas y su relación con estructuras genéticas. Las muestras, procedentes de hospitales de la ciudad de Cochabamba, fueron procesadas por el Instituto Gastroenterológico Boliviano Japonés; y los aislamientos fueron derivados a la Facultad de Bioquímica y Farmacia. Los aislamientos se obtuvieron de heridas, quemaduras, úlceras y aparato respiratorio. A todos se les realizó antibiograma mediante la técnica disco-placa para analizar la resistencia a los grupos de antibióticos testados observándose el alto porcentaje de resistencia en la mayoría de aislamientos y destacando que 4 aislamientos eran multirresistentes. Se llevó a cabo la detección de carbapenemasas mediante técnicas fenotípicas y genotípicas. Para la detección fenotípica se realizaron los test Hodge, Hodge con sulfato de zinc y DDST (Double Disk Synergy Test). En el test de Hodge resultaron positivos 25 aislamientos, lo cual nos indica la

presencia de carbapenemasas. Para la detección de metalobetalactamasas se realizaron los test de Hodge con sulfato de zinc y DDST; resultando negativo para este tipo de carbapenemasas. La detección genotípica de carbapenemasas se realizó mediante experimentos de amplificación por multiplex PCR para la detección de enzimas de tipo Oxacilinasas. Se detectó la carbapenemasa OXA-51 intrínseca de *A.baumannii* en 33 aislamientos y la carbapenemasa OXA-58 en 13 aislamientos. Todos los aislamientos mostraron bandas correspondientes a la presencia de integrones clase 1 y se comprobó la presencia simultánea de productos de 780 pb y 540 pb.

Palabras Clave: *A.baumannii*, imipenem, carbapenemasas, gen OXA-58, integrones

ABSTRACT

34 clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* were analyzed in this study in order to determine the presence of carbapenemases and its relationship with genetic structures. The samples were collected by staff at the Bolivian-Japanese Gastroenterological Institute at various hospitals

in the City of Cochabamba and sent to the Faculty of Biochemistry and Pharmacy. The isolates were taken from wounds, burns, ulcers and respiratory system. An antibiogram was carried out on isolate using the disk-plate technique to analyze resistance to the groups of antibiotics. A high percent of resistance was observed in most of the isolates and 4 of them were multi-resistant. The detection of carbapenemases was carried out applying phenotypic and genotypic techniques. For the phenotypic detection were used the Hodge test, Hodge with zinc sulfate and DDST (Double Disk Synergy Test) In the Hodge test, there were 25 positive isolates, indicating the presence of carbapenemases. To detect metalobetalactamase, the tests Hodge with zinc sulfate and DDST were tested, the result was negative for this carbapenemase. The genotypic detection of carbapenemases was carried out through amplification experiments by multiplex PCR to detect Oxacilinasa-type enzymes. Intrinsic OXA-51 carbapenemase of *A. baumannii* was detected in 33 isolates and OXA-58 carbapenemase in 13 isolates. All the isolates showed bands corresponding to type 1 integrons. The simultaneous presence of 780 pb and 540 pb products was proved.

Key Words: *A.baumannii*, imipenem, carbapenemases, gene OXA-58, integrons

INTRODUCCIÓN

Actualmente, *Acinetobacter baumannii* es considerado un patógeno emergente ya que han aumentado el número de aislamientos resistentes responsables de infecciones nosocomiales graves. Gran parte de estos aislamientos hospitalarios son además multirresistentes complicando el tratamiento y empeorando el pronóstico del paciente infectado por estos aislamientos¹.

Los carbapenems siguen siendo uno de los tratamientos más eficaces frente a las infecciones por *Acinetobacter* spp., aunque cada vez es más frecuente la descripción de cepas resistentes^{2,3}. A pesar de que estas cepas se han aislado de diferentes áreas geográficas en todo el mundo, en Europa parecía ser un fenómeno epidémico y en estudios recientes se ha demostrado la existencia de clones endémicos europeos^{4,5}. En estas

resistencias pueden estar implicados mecanismos de resistencia como la alteración en las proteínas de unión a penicilinas (PBP) o la disminución de la permeabilidad de la membrana externa o alteración en las bombas de flujo de la pared bacteriana. En los últimos años se ha observado un incremento en el número de cepas que producen carbapenemasas, siendo éste uno de los mecanismos más estudiados. La mayoría de estas enzimas descritas hasta el momento pertenecen a la clase molecular D del tipo OXA pero también se han identificado metalobetalactamasas del tipo IMP, VIM, SPM-1 y GIM-1^{3,6,7,8}.

En Latinoamérica, *Acinetobacter* spp. causa infección intrahospitalaria con frecuencias 2 a 10 veces mayores que en Canadá o EEUU y la prevalencia de la resistencia a imipenem es del 11,45%⁹.

Con el fin de establecer mecanismos moleculares, se realizaron varios estudios como en Brasil donde se describe la primera metalobetalactamasa, SMP-1^{10,11}. Diversas publicaciones dan evidencia de la presencia de integrones de tipo 1 y 2, donde reside la resistencia en bacterias gramnegativas obtenidas de productos patológicos en hospitales chilenos^{12,13}. En el 2006, encontramos un estudio en Bogotá, Colombia reportando la detección de un grupo endémico de *A.baumannii* durante sus 10 meses de estudio y la presencia del grupo OXA-23 como factor determinante de la resistencia a los carbapenémicos⁹. En el 2007, se reporta la diseminación de clones de *A.baumannii* con OXA-23 en hospitales de Colombia¹⁴.

En Bolivia, existe una elevada incidencia de bacterias gramnegativas multirresistentes y los datos previos con los que contamos proceden del Laboratorio Nacional de Referencia en Bacteriología Clínica LNRBC- INLASA que datan del año 2006, en los que se informa que en ese año hubo 241 aislamientos intra-hospitalarios de *Acinetobacter* spp. resistentes de los cuales el 1% eran resistentes frente a imipenem y al año siguiente, el número de aislamientos se incrementó a 581 con una resistencia del 4% a imipenem. Hasta la fecha no existen estudios sobre los mecanismos moleculares que podrían estar involucrados en esta resistencia¹⁵.

El objetivo principal de esta investigación fue determinar la presencia de carbapenemasas y su

relación con estructuras genéticas en aislamientos clínicos de *A.baumannii* aislados en varios hospitales de Cochabamba.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron 31 aislamientos procedentes del Complejo Hospitalario Viedma durante un período de 14 meses (desde abril del 2008 a mayo del 2009) que fueron procesadas en el laboratorio de Microbiología del Instituto Gastroenterológico Boliviano-Japonés y 3 aislamientos de la Clínica de Los Olivos en Cochabamba, Bolivia. Los aislamientos en un número de 16, se obtuvieron de heridas, quemaduras y úlceras; 9 del aparato respiratorio, 3 hemocultivos, 3 del aparato digestivo y 3 del sistema renal.

Determinación de la susceptibilidad antibiótica. El estudio de la susceptibilidad antibiótica se realizó mediante el método de difusión en disco-placa, basado en el trabajo de Kirby-Bauer método recomendado por National Committee for Clinical Laboratory Standards (CLSI-NCCLS), con los siguientes antibióticos: amikacina (AMK), trimetropin/sulfametoxazol (SXT), Cloranfenicol (C), amoxicilina/clavulánico (AMC), ampicilina/sulbactam (SAM), aztreonam (ATM), imipenem (IPM), meropenem (MEM), ceftriaxona (CRO), ceftazidima (CAZ), cefepime (FEP), ciprofloxacino (CIP).

La lectura de estos es mediante la medida de los halos de inhibición alrededor del disco y se interpretan basándose en las tablas establecidas por el CLSI-NCCLS (2005), reportando a cada aislamiento clínico de *A. baumannii* como sensible(S), intermedia(I) o resistente(R)^{16,17}.

Detección fenotípica de carbapenemasas. Todos los aislamientos se analizaron mediante los test fenotípicos Hodge, Hodge + ZnSO₄ y DDST (Double Disk Test)^{18,19,20,21}.

Para la técnica de Hodge se inoculó la superficie de una placa de agar Muller Hinton con la cepa control *E. coli* ATCC25922 sensible a imipenem,

se colocó un disco imipenem (10µg) en el centro y se inocularon radialmente las cepas que se iban a ensayar. Tras la 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 Hodge + ZnSO₄ difiere de la anterior en que al disco imipenem (10 µg) se le añadió directamente ZnSO₄ (1 ml de agua molecular y 0,4 gr ZnSO₄).

Para el test de doble disco (DDST) se realizó inoculando la placa de agar Muller Hinton con 100µl de un cultivo en caldo de la cepa problema con una turbidez de 0,5 U de la escala McFarland y colocando un disco de imipenem (10µg) y otro con 10µl EDTA/SMA a una distancia de 10 mm. Este test se lee positivo cuando hay sinergia entre los dos discos, entre el de imipenem y el de EDTA+SMA(en forma de flecha desde EDTA/SMA a IMP) y si no hay esa sinergia es negativo.

Para confirmar la presencia de carbapenemasas tipo metalobetalactamas, es necesario el resultado positivo en ambos tests; Hodge + ZnSO₄ y DDST, si el primero es positivo y el segundo negativo, se considera negativa la presencia de metalobetalactamasas.

Detección genotípica de carbapenemasas. La detección de carbapenemasas mediante métodos moleculares se llevó a cabo por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y se detectaron los genes OXA-23, OXA-40, OXA-51 y OXA-58 mediante la técnica multiplex PCR^{22,23,24}.

Los experimentos genéticos para detectar los genes OXA-23, OXA-40, OXA-51 y OXA-58 se llevaron a cabo con los cebadores forward y reverse de cada uno de ellos en las siguientes condiciones: 1 ciclo inicial de 95°C 4 min, seguido de 30 ciclos de 94°C 25s, 52°C 40s, 72°C 50s y un ciclo final de 72°C 6 min. La secuencia de los cebadores y el tamaño del producto de amplificación se encuentran en la Tabla 1.

Tabla 1. Secuencias de los iniciadores utilizados para la detección de carbapenemasas en la prueba de multiplex PCR y el tamaño del producto de amplificación

Iniciador	Secuencia	Tamaño de producto de amplificación
OXA-23 F	5'- GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA-3'	501 bp
OXA-23 R	5'- ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT-3'	
OXA-40 F	5'- GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA-3'	246bp
OXA-40 R	5'- AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT-3'	
OXA-51 F	5'- TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG-3'	353bp
OXA-51 R	5'- TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG-3'	
OXA-58 F	5'- AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG-3'	599 bp
OXA-58 R	5'- CCC CTC TGC GCT CTA CAT AC- 3'	

Una vez realizada la PCR, el ADN se visualizó y analizó mediante la realización de electroforesis en gel de agarosa 1,2% y se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta.

Detección de estructuras genéticas móviles. La detección de integrones de clase 1 se llevó a cabo mediante PCR con los iniciadores 3'CS (5'-AAAGCAGACTTGACCTGA- 3') y 5'CS (5'-GGCATCCAAGCAGCAAG- 3'). Las condiciones de amplificación fueron: 94°C

durante 55s; 55°C durante 55s y 72°C durante 55s^{13, 25, 26}.

RESULTADOS

En este estudio se analizaron un total de 34 aislamientos clínicos de *A.baumannii* recogidos en dos hospitales de la ciudad de Cochabamba. La mayoría de los aislamientos procedían de heridas, úlceras, quemaduras. Ver Figura 1.

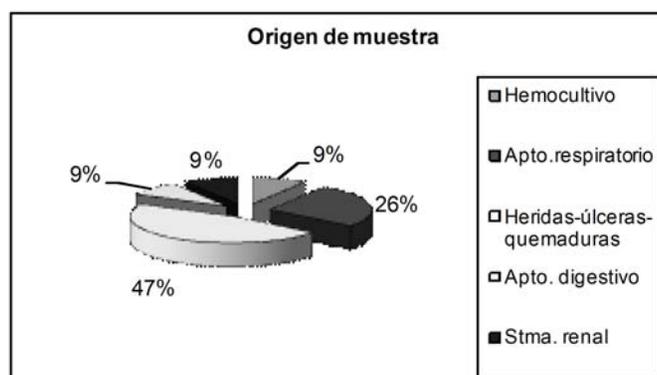


Fig 1. Aislamientos de *A.baumannii*, obtenidos de las muestras clínicas, descritas en porcentaje de acuerdo a la procedencia

El análisis de susceptibilidad a los antibióticos se llevó a cabo mediante la técnica de disco-placa. Mediante el antibiograma se pudo observar el alto porcentaje de resistencia en la mayoría de los aislamientos destacando que cuatro aislamientos eran multiresistentes. Observando la Figura 2 que recoge el perfil de susceptibilidad de los aislamientos de *A.baumannii*, se vio que la

resistencia fue alta para afenicoles (91,17%), cefalosporinas (88,23%), monobactámicos (85,29%) y quinolonas (82,35%) y se encontró una resistencia intermedia para aminoglucósidos, penicilinas y sulfamidas (73,52%). Los carbapenems presentaron la resistencia más baja de todos los grupos de antibióticos testados con un 39,71%. Ver Figura 2.

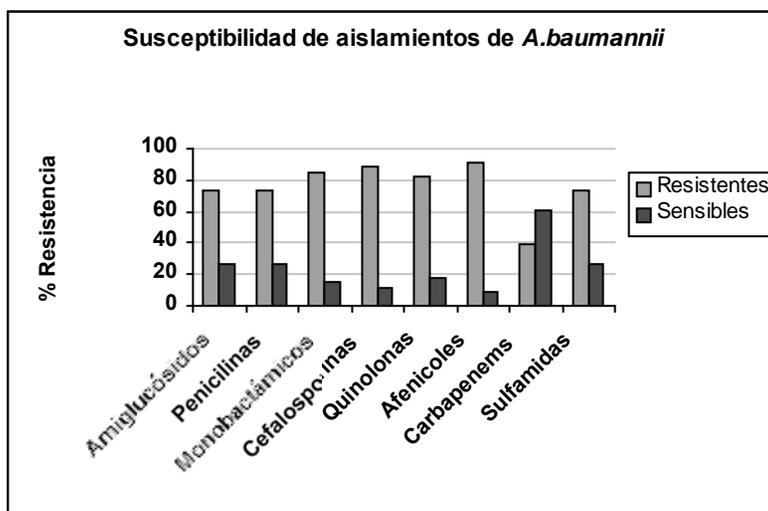


Fig 2. Susceptibilidad de aislamientos de *A.baumannii* a los diferentes antibióticos, expresado en porcentaje

La detección de carbapenemasas se llevó a cabo mediante técnicas fenotípicas y genotípicas. Para la detección fenotípica se realizaron los test Hodge, Hodge con sulfato de zinc y DDST (Double Disk Sinergy Test). Mediante el test de Hodge se obtuvo un resultado positivo en 25 aislamientos, lo cual indicó la presencia de carbapenemasas. Los test de Hodge con sulfato

de zinc junto con el DDST fueron utilizados para la detección de metalobetalactamasas, el primero dio positivo en 23 aislamientos mientras que el DDST resultó negativo para todos los aislamientos. Ver Figura 3. Al no ser ambos test positivos, se consideró negativa la presencia de este tipo de carbapenemasas.

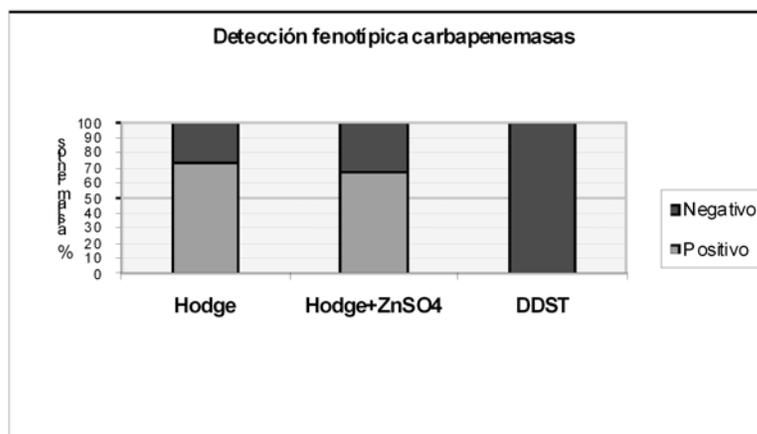


Fig 3. Detección fenotípica de carbapenemasas en aislamientos de *A.baumannii* expresada en porcentaje.

La determinación genotípica de carbapenemasas se llevó a cabo por multiplex PCR para la detección de enzimas tipo Oxacilinasas. Se detectó el gen de carbapenemasa OXA-51

intrínseca de *A.baumannii* en 33 aislamientos y en 13 además se detectó el gen de carbapenemasa OXA-58. Ver Figuras 4 y 5.

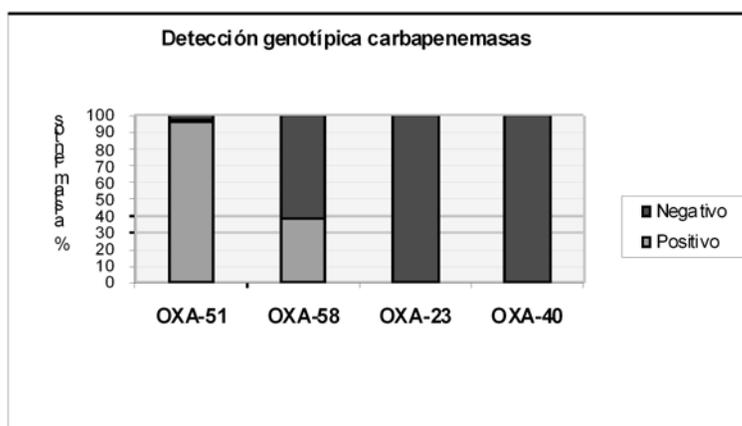


Fig 4. Detección genotípica de carbapenemasas en aislamientos de *A.baumannii* expresado en porcentaje.

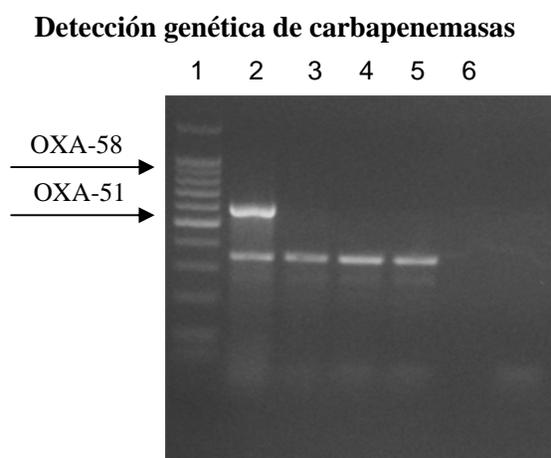


Fig 5 . Detección de OXA-23,-40,-51,-58 por multiplex PCR. En carril 1 marcador de tamaño, de 100pb; carriles 2 a 5, aislamientos de *A.baumannii* observando en el carril 1 la presencia de OXA-51 y OXA-58 y los carriles 3, 4 y 5 OXA-51. Carril 6 control negativo.

Se estudió la presencia de estructuras genéticas móviles, concretamente integrones. Todos los aislamientos mostraron bandas correspondientes a la presencia de integrones de clase I. En las 34

muestras analizadas se comprobó la presencia simultánea de los fragmentos de 780 pb y 540 pb (Fig 6).

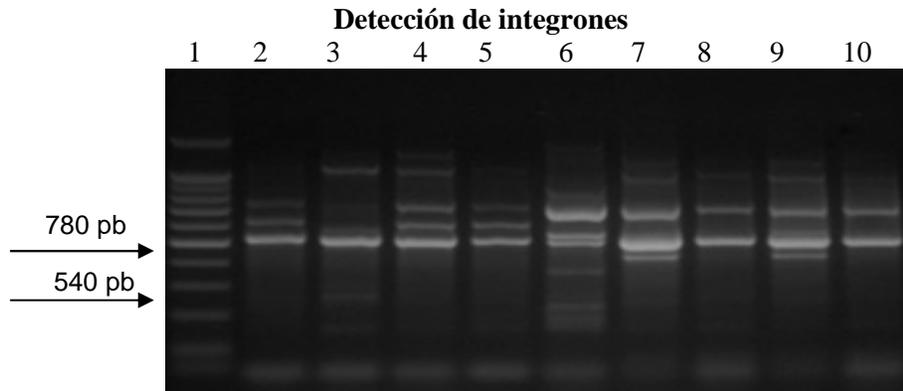


Fig 6. Detección de integrones clase 1, con iniciadores 5'CS y 3'CS. Carril 1, marcador de tamaño; carriles 2 a 10, aislamientos de *A. baumannii* donde se observan bandas de 540 y 780 pb correspondiente a integrones clase 1.

DISCUSIÓN

Las infecciones por *A.baumannii* son de gran preocupación ya que este bacilo ha emergido como un significativo patógeno en pacientes hospitalizados y siendo en Latinoamérica el 5,3% de todos los aislados de bacteriemias nosocomiales¹². En el estudio de Cochabamba se trabajó con aislamientos clínicos principalmente de heridas, úlceras, quemaduras (46%), aparato respiratorio (27%), hemocultivo, aparato digestivo y sistema renal (9% de cada uno).

El aislamiento de cepas de *A.baumannii* resistentes a carbapenems es cada vez más frecuente, sobre todo en el Sur de Europa^{23,27}, así también están comenzando a reportarse en varios países de Latinoamérica como en Brasil y Colombia^{9,10,11,14}.

El porcentaje global de susceptibilidad encontrado en nuestro estudio mostró que eran los carbapenems los más activos, con un 60,31% de sensibilidad y un 39,69% de resistencia. Los afenicoles, cefalosporinas, monobactámicos y quinolonas eran muy poco activos mientras algo más de actividad presentaban los aminoglucósidos, penicilinas y sulfamidas. Estos datos de susceptibilidad a antibióticos de *A.baumannii* coinciden con la base de datos del estudio SENTRY hecho en Latinoamérica desde 1997 al 2003¹².

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 meropenem³. Este hecho hace necesario el desarrollo de técnicas rápidas y específicas para lograr la identificación de estas enzimas.

Los test fenotípicos que permiten determinar la presencia de carbapenemasas son fáciles de realizar. Los test de Hodge y Hodge+ZnSO₄ ofrecieron resultados claros y fácilmente interpretables. En el caso de test de doble disco, DDST, fue un poco más complicada su interpretación. En este test hay que añadir que las variaciones en el disco o distancia entre los discos en la placa varía de forma importante el resultado. Este hecho también pudiera ser explicado debido a que la solución de EDTA/SMA puede interferir en el crecimiento de las cepas y esto distorsionaría el resultado. Sin embargo la lectura del mismo mostraba resultados negativos claros. Los test fenotípicos descritos son utilizados como técnicas rápidas de laboratorio para la detección de carbapenemasas y esto lo encontramos en varios trabajos publicados^{4,9}. A pesar de la utilidad de los test fenotípicos los resultados obtenidos en este estudio indican y apoyan la sugerencia de otros autores con respecto a la necesidad de realizar también test de identificación genética para la caracterización específica de nuevas carbapenemasas de tipo OXA. De hecho, en los aislamientos detectamos la presencia de la OXA-51 intrínseca de la especie *A.baumannii* y la OXA-58. El hecho de que aparezcan estas dos carbapenemasas, sobre

todo la OXA-58, es de suma importancia en Bolivia ya que no hay estudios, ni publicaciones que reporten la presencia de carbapenemasas de tipo OXA en el país. Esta enzima OXA-58 fue reportada por primera vez en Francia, en el año 2005^{28,29} y ya se considera endémica de mencionado país europeo, junto con Turquía y Los Balcanes³⁰. Otras enzimas de tipo OXA están presentes en otros países del mundo, siendo la OXA-40 endémica de España^{4,5,30}. En países de Latinoamérica, como en Brasil y Colombia reportaron la presencia de la carbapenemasa OXA-23^{9,10,11,14}, pero no de la OXA-58.

La resistencia múltiple que presentan los aislamientos de *A.baumannii* puede ser debido a otros mecanismos de resistencia como la presencia de estructuras genéticas móviles como los integrones. En todos los aislamientos estudiados se detectaron los integrones de clase 1, la presencia de estos no está tan relacionado con la resistencia a carbapenems sino más con los otros grupos de antibióticos como se observa en nuestros resultados, la múltiple resistencia a todos los grupos testados excepto a carbapenems. Parece ser que la carbapenemasa OXA-58 está relacionada e identificada con otro tipo de estructuras genéticas móviles como son los plásmidos según un estudio hecho en Roma, Italia³¹. En trabajos realizados en Chile, se encontró la presencia de integrones de clase 2 en aislamientos de *A.baumannii* y que estaban relacionados con la resistencia a aminoglicósidos y sulfamidas y en otro trabajo del mismo país se relacionan este tipo de integrones con la resistencia a cefalosporinas de tercera generación. Estas estructuras permiten a la bacteria captar genes que le confieren ventajas selectivas y le permiten una rápida adaptación a los cambios ecológicos, como a la quimioterapia antimicrobiana¹³.

La presencia de las carbapenemasas OXA-51 intrínseca de la especie de *A.baumannii* y OXA-58 junto con la presencia de integrones de clase 1 en nuestros aislamientos, hace que presenten una múltiple resistencia a los antimicrobianos analizados así como a los carbapenems que recordemos que actualmente siguen siendo de primera elección en la terapia antimicrobiana frente a cepas multirresistentes. Nuestros resultados sugieren la necesidad de un riguroso

control de estos aislamientos para evitar su diseminación en el ambiente hospitalario y evitar un grave problema de resistencia al tratamiento.

AGRADECIMIENTOS

A la Agencia de Cooperación Española (AECID) y la Universidad del País Vasco por el apoyo económico para la realización de este estudio; al Instituto Gastroenterológico Boliviano Japonés; a la Clínica Los Olivos, por el envío de cepas; y a la Facultad de Bioquímica y Farmacia de la UMSS por su apoyo incondicional, tanto humano como logístico.

REFERENCIAS

1. Landman D, Quale J. *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Pathogens of the Millennium. Ochs Clinic Repor . 2002; 14 (1) .
2. Livermore DM. β - Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev. 1995; 8: 557-584.
3. Nordman P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gramnegative aerobes. Clin Microbiol Infect. 2002; 8: 321-331.
4. Gallego L, Canduela MJ, Sevillano E, *et al*. Carbapenemase detection in *Acinetobacter baumannii* clones resistant to imipenem. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2004; 22: 262-6.
5. Canduela MJ, Gallego L, Sevillano E, Valderrey C, Calvo F, Pérez J. Evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates obtained from elderly patients with respiratory tract infections. J Antimicrob Chemother. 2006; 57: 1220-1222.
6. Livermore D. Metallo- β -Lactamases and other carbapenemases. ISAAR. 2003.
7. Zhiyong Z, Xiaojun L, Yanyu G. Metallo- β -lactamases of non-fermenting Gram-negative bacteria. Med Microbiol Rev. 2003; 14: 79-93.
8. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo- β -Lactamases: Quiet before the Storm?. Clin. Microbiol. 2005; 306-325.
9. Orquidea Pinzon J, Mantilla JR, Valenzuela EM, Fernández F, Alvarez C.A, Osorio EJ. Caracterización molecular de *Acinetobacter baumannii* provenientes de la unidad de quemados de un hospital de tercer nivel de Bogotá. Infectio. 2006; 10 (2): 71-78.
10. Toleman MA, *et al*. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β - Lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. J of Antimicrob Chemoter. 2002; 50: 673-679.

11. Gales AC, *et al.* Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. *J of Antimicrob Chemoter.* 2003; (52): 699-702.
12. Diomedi A. Infecciones por *A.baumannii* pan-resistente. Consideraciones epidemiológicas y de manejo antimicrobiano actualizado. *Rev Chile Infec.* 2005; 22 (4): 298-300.
13. González G, Mella S, Zemelman R, Bello H, Dominguez M. Integrases y cassettes genéticas de resistencia: estructura y rol frente a los antibacterianos. *Rev. Med. Chile* 2004; 132: 619-626.
14. Villegas M.V, Kattan J,N, Correa A.M, *et al* y Grupo Colombiano de Resistencia Bacteriana Nosocomial. Dissemination of *A.baumannii* clones OXA-23 carbapenemases in Colombian hospital. *Antimicrob Agents Chemoter* 2007; 51: 2001-4.
15. Trigo C, Damiani E. Guía práctica para la interpretación clínica del antibiótico. Laboratorio Nacional de Referencia en Bacteriología Clínica. La Paz: LNRBC-INLASA Y APUA; 2007.
16. National Committee for Clinical Laboratory Standards NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility for bacteria that grow aerobically. 6th edition. M7-A6, USA: Wayne, PA; 2003.
17. Vila J, Francesc M. Lectura interpretada del antibiograma de bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enferm Infec Microbiol Clin.* 2002; 20 (6): 304-312.
18. Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo- β -lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 4623-4629.
19. Lee K, Chong Y, Shin HB *et al.* Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- β -lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol and Infect.* 2001; 7: 88 - 102.
20. Yong D, Lee K, Yum JH, Shin HB, Rossolini GM, Chong Y. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo- β -lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(10): 3798-3801.
21. Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H, Goto M. Convenient test for screening metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 40-43.
22. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, *et al.* Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents.* 2006; 27 (4): 351-3.
23. Bou G, Oliver A, Martinez-Beltran J. OXA-24, a novel Class D beta-lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemoter.* 2000; 44:1556-1561.
24. Senda K , Arakawa Y, Ichihama S *et al.* PCR Detection of Metallo- β -Lactamase Gene (*bla_{IMP}*) in Gram-Negative Rods resistant to Broad-Spectrum β -lactams. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2909-2913.
25. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, Rossolini GM. Cloning and Characterization of *bla_{VIM}*, a New Integron-Borne Metallo- β -Lactamase Gene from a *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolate. *Antimicrob Agents Chemoter.* 1999; 43 (7): 1584-1590.
26. 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.
27. 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.
28. Héritier C, Dubouix A, Poirel L, Marty N, Nordmann P. A nosocomial outbreak of *Acinetobacter baumannii* isolates expressing the carbapenem-hydrolysing oxacillinase OXA-58. *J Antimicrob Chemoter.* 2005; 55: 115-118.
29. Poirel L, Marquè S, Héritier C, Segonds C, Chabanon G, Nordmann P. OXA-58, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemoter.* 2005; 49: 202 - 208.
30. Marqué S, Poirel L, Héritier C, *et al.* Regional Occurrence of plasmid-mediated Carbapenem-Hydrolyzing oxacillinase OXA-58 in *Acinetobacter* spp. in Europe. *J Clin Microbiol.* 2005; 43 (9): 4885-88.
31. Giordano A, Varesi P, Bertini A, Villa L, Dionisi A.M, Venditti M, *et al.* Outbreak of *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-58 in Rome, Italy. *Microbial drug resist.* 2007; 13 (1): 37-43.