



# Producción de $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de *Acinetobacter baumannii* aisladas en hospitales de la VIII<sup>a</sup> Región, Chile

Carolina Pino I., Mariana Domínguez Y., Gerardo González R., Helia Bello T., Marcela Sepúlveda A., Sergio Mella M., Claudia Zemelman M. y Raúl Zemelman Z.

## Extended spectrum $\beta$ lactamases (ESBL) production in *Acinetobacter baumannii* strains isolated from Chilean hospitals belonging to VIII Region

The resistance of *Acinetobacter baumannii* to  $\beta$ -lactam antibiotics is mainly due to the synthesis of  $\beta$ -lactamasas. From a clinical point of view, this bacteria and others, grouped under the acronym SPACE (S: *Serratia*, P: *Pseudomonas*, A: *Acinetobacter*, C: *Citrobacter*, E: *Enterobacter*) are essentially Amp-C  $\beta$ -lactamasas producers. There is no local information about ESBL presence in *Acinetobacter*. We studied ESBL production using the Ho and col. technique modified by adding cloxacillin as chromosomal  $\beta$ -lactamasas inhibitor. From 69 isolates, with resistance to at least one third generation cephalosporin, only 7 showed positive synergy test. Four of these amplified for TEM family gene, and one of these amplified also for the OXA family. Our study found a low ESBL production percentage, which agrees with the premise of Amp-C as the main mechanism of resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics in *A. baumannii*. However, the ESBL description in these bacteria emphasizes the capacity of expressing multiple resistance mechanisms.

**Key words:** *Acinetobacter*, extended spectrum  $\beta$  lactamasas, Amp-C.

**Palabras claves:** *Acinetobacter*,  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido, Amp-C.

**Universidad de Concepción, Chile**

Facultad de Ciencias Biológicas  
Departamento de Microbiología  
Laboratorio de Antibióticos (CPI,  
MDY, GGR, HBT)

Facultad de Medicina,  
Departamento de Medicina  
Interna (MSA, SMM),

**Universidad San Sebastián,  
Concepción, Chile (CZM, RZZ)**

Recibido: 5 abril 2006

Aceptado: 22 septiembre 2006

**Correspondencia a:**

Mariana Domínguez Yévenes  
mdomingu@udec.cl

## Introducción

La resistencia de bacilos gramnegativos a los antimicrobianos  $\beta$ -lactámicos se basa, fundamentalmente, en la síntesis de  $\beta$ -lactamasas, cuyos genes pueden encontrarse en el cromosoma o en elementos genéticos extracromosomales, como plásmidos, transposones e integrones<sup>1,2</sup>. Cuando los genes de resistencia se encuentran a nivel extracromosomal pueden ser transferidos a bacterias susceptibles, determinando la rápida diseminación de éstos y, por lo tanto, favoreciendo la aparición de aislados resistentes<sup>3</sup>.

Por otra parte, del punto de vista estrictamente clínico, se tiende a considerar que *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* producen principalmente  $\beta$ -lactamasas de codificación cromosomal, conocidas como cefalosporinasas del tipo AmpC o  $\beta$ -lactamasas del grupo 1<sup>4</sup>. Estas enzimas son capaces de inactivar en forma eficiente aminopenicilinas, ureido-

penicilinas, cefalosporinas de distintas generaciones y cefamicinas<sup>5</sup>. Otras especies bacterianas, que junto con las anteriores se encuentran agrupadas con el acrónimo SPACE (S: *Serratia*; P: *Pseudomonas*; A: *Acinetobacter*; C: *Citrobacter*; E: *Enterobacter*), también producen en forma prioritaria  $\beta$ -lactamasas de codificación cromosomal. Es así que *Enterobacter* constituye el género arquetípico en la producción de este tipo de enzimas<sup>6</sup>. Además, desde un enfoque eminentemente práctico, los aislados de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* producen, fundamentalmente,  $\beta$ -lactamasas de codificación extracromosomal, capaces de hidrolizar adecuadamente cefalosporinas de distintas generaciones pero, particularmente, moléculas de tercera generación (metoxi-imino aminotiazolil cefalosporinas) y también aztreonam. A este tipo de enzimas se les denomina  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y constituyen un problema epidemiológico de importancia y distribución global<sup>7-9</sup>.

Estos antecedentes permiten al médico clínico tener



una aproximación de las  $\beta$ -lactamasas producidas por las bacterias resistentes a cefalosporinas, de acuerdo con el antibiograma y especie aislada. Así, un aislado de *E. coli* que demuestre resistencia, al menos, a una cefalosporina de tercera generación (C3G), sugerirá, fuertemente que el mecanismo principal de resistencia es la producción de BLEE. Por el contrario, la resistencia de una cepa del grupo SPACE a C3G, sugerirá la producción de  $\beta$ -lactamasas del tipo AmpC, que no son inhibidas por ácido clavulánico<sup>5,6</sup>. Esta observación clínica permite entender conceptualmente el mecanismo principal de resistencia y, por tanto, tomar decisiones, tanto del punto de vista terapéutico, como epidemiológico (medidas de control de infección y/o políticas de uso de antimicrobianos) a implementar en un determinado caso clínico y en un contexto hospitalario concreto. Sin embargo, tiene una serie de limitaciones, debido a que en muchas ocasiones los aislados presentan, además, otros mecanismos de resistencia como bombas de eflujo<sup>10,11</sup>, alteraciones de la permeabilidad<sup>12</sup> y, últimamente, la creciente descripción de  $\beta$ -lactamasas que, si bien pudieron, originalmente, haber sido codificadas en el cromosoma, han sido capaces de estabilizarse en plásmidos, siendo en la actualidad transferibles<sup>13</sup>. Por lo tanto, en la práctica clínica, cada aislado resistente cuenta con un amplio repertorio de mecanismos de resistencia, donde la expresión fenotípica sugerirá los principales, pero no la totalidad de ellos.

En Chile se dispone de información sobre cepas de *K. pneumoniae* y *E. coli* productoras de BLEE<sup>14</sup>; sin embargo, la información sobre la presencia de BLEE en cepas de *A. baumannii* es escasa. El objetivo de este trabajo fue investigar la presencia de BLEE en cepas de *A. baumannii* aisladas en hospitales de la VIII<sup>a</sup> Región administrativa de Chile.

### Materiales y Métodos

**Cepas bacterianas.** Se incluyeron 132 cepas de *A. baumannii* aisladas en el período 1995-1998 desde productos patológicos, en centros hospitalarios de las ciudades de Concepción, Talcahuano, Los Ángeles y San Carlos. Las cepas fueron mantenidas en caldo tripticasa-glicerol (2:1) a -70°C, en el Laboratorio de Antibióticos de la Universidad de Concepción.

**Estudio de susceptibilidad a agentes antibacterianos.** Se determinaron las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de ampicilina, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefepima y aztreonam, obtenidos comercialmente, mediante dilución seriada en agar, de acuerdo a las recomendaciones de NCCLS<sup>15</sup>. Se incluyeron las cepas de *E. coli* ATCC 25922, *Staphylococcus*

*aureus* ATCC 29213 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 como cepas controles.

**Detección cualitativa de BLEE.** Se seleccionaron 69 cepas de *A. baumannii*, de acuerdo con sus patrones de resistencia, que incluía la resistencia, al menos, a una C3G. La síntesis de BLEE fue investigada mediante una modificación del método de Ho y col<sup>16</sup>, que consiste en realizar antibiogramas con C3G, cefalosporinas de cuarta generación o aztreonam, en presencia y ausencia de 4  $\mu$ g/ml de ácido clavulánico (AC). La modificación consistió en adicionar, a estas placas, 100  $\mu$ g/ml de cloxacilina con el objetivo de inhibir parcial o totalmente las cefalosporinas cromosomales y, de esta manera, evidenciar la actividad de BLEE. Para obtener una mayor sensibilidad del método utilizado, se consideró sinergia positiva (indicadora de producción de BLEE) un aumento del halo de inhibición igual o superior a 5 mm, en presencia de los inhibidores<sup>16</sup>. Los discos empleados en este estudio fueron cefotaxima (30  $\mu$ g), ceftazidima (30  $\mu$ g), cefepima (30  $\mu$ g), ceftriaxona (30  $\mu$ g) y aztreonam (30  $\mu$ g).

**Determinación del punto isoeléctrico (pI).** Se realizó mediante isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida con anfolitas en un rango de pH de 3 a 10, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (BIORAD model 111 mini IEF cell), empleando extractos enzimáticos crudos. Se incluyó como controles cepas bacterianas productoras de  $\beta$ -lactamasas TEM 1 (pI 5,4); SHV-1 (pI 7,6); SHV-5 (pI 8,0) y MIR-1 (pI 8,4). La detección de las  $\beta$ -lactamasas se realizó colocando en contacto el gel con un papel filtro impregnado en una solución de 50  $\mu$ g/ml de nitrocefina<sup>17</sup>.

**Detección de genes de enzimas TEM, SHV, PER-1 y OXA-10.** Se realizó mediante la amplificación por reacción de polimerasa en cadena (RPC) en un termociclador GenAmp PCR System 2400 (Perkin-Elmer). Se utilizó una mezcla de reacción de 25  $\mu$ L consistente en: 2,5  $\mu$ L dNTPs (0,1 mM); 1,25  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> (50 mM); 2,5  $\mu$ L tampón RPC 10x; 0,125  $\mu$ L Taq polimerasa (1.5 U); 1,5  $\mu$ L de cada partidor (20 pmol/ $\mu$ L); 10  $\mu$ L del templado de ADN, obtenido por ebullición y agua destilada estéril c.s.p. 25  $\mu$ L. Los partidores y condiciones de RPC fueron los descritos previamente para *bla*<sub>TEM</sub><sup>18</sup>, *bla*<sub>SHV</sub><sup>19</sup> y *bla*<sub>PER-1</sub><sup>20</sup>. Para la detección de genes de la familia *bla*<sub>OXA-10</sub> se siguió el esquema de amplificación y restricción descrito por Vahaboglu y col<sup>21</sup>.

El producto de amplificación se visualizó mediante electroforesis en geles de agarosa 1% y tinción con bromuro de etidio 0,5 mg/L.

### Resultados

Se encontró elevados niveles resistencia de las cepas de *A. baumannii* a todos los antibacterianos



**Tabla 1. Niveles y frecuencia de resistencia a antimicrobianos  $\beta$ -lactámicos en cepas de *Acinetobacter baumannii* aisladas en hospitales de la VIII Región entre los años 1995 y 1998**

Período de aislamiento	Antimicrobiano	Concentración inhibitoria mínima ( $\mu\text{g/ml}$ )			% cepas resistentes
		Rango	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	
1995-1996 (68 cepas)	Ampicilina	$\leq 4$ - > 256	> 256	> 256	86,8
	Cefotaxima	$\leq 4$ - > 256	64	256	57,3
	Ceftazidima	8 - > 256	64	64	47,0
	Ceftriaxona	8 - > 256	128	256	58,8
	Cefepima	$\leq 4$ - > 256	64	256	55,9
	Aztreonam	8 - 256	128	256	94,1
1997-1998 (64 cepas)	Ampicilina	16 - > 256	> 256	> 256	96,9
	Cefotaxima	16 - > 256	256	> 256	75,0
	Ceftazidima	16 - 256	64	128	57,8
	Ceftriaxona	16 - > 256	256	> 256	79,7
	Cefepima	16 - > 256	64	> 256	59,4
	Aztreonam	$\leq 4$ - > 256	128	256	90,6

$\beta$ -lactámicos, evidenciado en los valores de CIM<sub>50</sub>, CIM<sub>90</sub> y porcentajes de resistencia (Tabla 1). Además, la frecuencia de cepas resistentes aumentó, en todos los casos, al comparar el período 1997-1998 con respecto a 1995-1996.

Mediante el método de sinergia en presencia de cloxacilina se observó que, de las 69 cepas seleccionadas para investigar la presencia de BLEE, tan sólo 7 cepas (10,1%) presentaron sinergia entre los antimicrobianos ensayados y AC. El promedio de incremento del halo de inhibición osciló entre 5,5 mm para aztreonam y 9,8 mm para cefepima, siendo esta cefalosporina, seguida de ceftazidima y cefotaxima, los mejores indicadores de producción de BLEE. Claramente se evidenció la utilidad de cloxacilina, ya que al emplear sólo AC, el promedio de aumento del halo de inhibición no superó los 6,8 mm y, además, se detectó sinergia indicativa de presencia de BLEE en un menor número de cepas (datos no mostrados).

El estudio de pI de las  $\beta$ -lactamasas producidas por estos aislados, indicó la presencia de dos o más enzimas (Tabla 2). Todas las cepas presentaron una enzima de pI 5,4 y otra de pI  $\geq 8,0$  y sólo una cepa presentó, además, una enzima de pI 7,0. Cuatro cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas con pI 5,4 amplificaron el fragmento intragénico de tamaño esperado para el gen de la familia TEM y sólo una de ellas, además, amplificó para el gen de la subfamilia OXA-10, descartándose las enzimas OXA-10 y OXA-17, ya que no se logró restricción del producto de RPC con las enzimas respectivas. No se obtuvo amplificación de genes de  $\beta$ -lactamasas del tipo SHV ni PER-1 (Tabla 2).

**Tabla 2. Punto isoeléctrico (pI) y detección de genes BLEE en cepas de *Acinetobacter baumannii* con sinergia positiva**

Cepa	pI	Amplificación por RPC de <i>bla</i> :					Probables $\beta$ -lactamasas
		TEM*	SHV	OXA-10 <sup>†</sup>	PER-1		
95- 5	5,4 / 8,0	-	-	-	-	CTX-M-2, PER-2, AmpC	
95-25	5,4 / 8,0	-	-	-	-	CTX-M-2, PER-2, AmpC	
95-27	5,4 / 8,5	+	-	-	-	TEM, PER-2, AmpC	
95-40	5,4 / 8,5	+	-	-	-	TEM, PER-2, AmpC	
97-28	5,4 / 9,0	+	-	-	-	TEM, PER-2, AmpC	
97-45	5,4 / 8,5	-	-	-	-	CTX-M-2, PER-2, AmpC	
97-53	5,4 / 7,0 / 8,4	+	-	+	-	TEM, OXA, PER-2, AmpC	

\*  $\beta$ -lactamasa TEM-1 o TEM de espectro extendido  
<sup>†</sup>  $\beta$ -lactamasa de subfamilia OXA-10

## Discusión

*Acinetobacter baumannii* es un importante patógeno intrahospitalario aislado, principalmente, de pacientes con neumonía nosocomial internados en unidades de cuidados intensivos<sup>22</sup>. Se caracteriza por ser multiresistente<sup>23</sup>, lo que conduce a uno de los principales problemas para el médico clínico, como es el tratamiento de las infecciones producidas por esta bacteria. La resistencia a C3G presentada por este microorganismo se atribuye, principalmente, a la presencia de cefalosporinasas codificadas en el cromosoma<sup>24</sup>. Sin embargo, algunos trabajos sugieren la síntesis de BLEE<sup>25,26</sup>, aunque su detección, en presencia



de las enzimas cromosomales, resulta dificultosa. De ahí que es importante resaltar que en este trabajo se inhibió las cefalosporinas cromosomales con cloxacilina, permitiendo la visualización de la acción inhibitoria del ácido clavulánico sobre las BLEE. El método de sinergia descrito por Ho y col<sup>16</sup>, ha demostrado equivalencia con el método confirmatorio de BLEE establecido por el CLSI<sup>27,28</sup> y, más aún, en un estudio con cepas chilenas de *K. pneumoniae*, se informó poseer mayor sensibilidad en la detección de este tipo de  $\beta$ -lactamasas<sup>29</sup>.

En los aislados en los cuales se obtuvo sinergia por el método de difusión en agar, las CIMs fueron variables, incluso algunos valores indican que las cepas eran fenotípicamente susceptibles a los antimicrobianos estudiados. Sin embargo, el hecho de aumentar la susceptibilidad a aztreonam, cefepima y C3G, en presencia de los inhibidores, indica que el complejo enzimático hidroliza estos antimicrobianos en cierto grado. Este hallazgo junto con los puntos isoelectricos y detección de genes codificantes de BLEE, sugiere fuertemente la presencia de BLEE en estos aislados.

De acuerdo con el pI de 5,4 en todas las cepas que mostraron sinergia, se sugiere la producción de una  $\beta$ -lactamasa tipo TEM, lo cual se confirmó con RPC en cuatro cepas. Esta enzima puede corresponder a la enzima TEM-1, ampliamente distribuida entre los bacilos gramnegativos, como así también a alguna BLEE de esta familia, ya que actualmente se encuentran descritas en literatura varias de estas enzimas que comparten el mismo pI<sup>2,4</sup>. Por otra parte, a diferencia de lo encontrado en otros países<sup>20</sup>, las cepas chilenas no producen la enzima PER-1 que otorga elevados niveles de resistencia a cefepima y C3G. Sin embargo, es de interés el hallazgo de una enzima relacionada con la subfamilia OXA-10, informada previamente en cepas de *P. aeruginosa*<sup>21</sup>, siendo éste uno de los primeros reportes de una enzima de la familia OXA en cepas chilenas de *A. baumannii*. Queda la interrogante sobre el tipo de  $\beta$ -lactamasas producidas por 3 cepas con prueba de sinergia positiva y ausencia de amplificación por RPC con los partidores utilizados. La enzima de pI 5,4 podría corresponder a una  $\beta$ -lactamasa PER-2, como ha sido informado recientemente en Argentina<sup>30</sup>. Por otra parte, en las cepas en las que se encontró un

pI de 8,0 cabe la posibilidad de estar presente el gen *bla*<sub>CTX-M-2</sub><sup>31</sup> y, con mayor seguridad, una cefalosporinasa tipo AmpC, especialmente por el efecto de cloxacilina observado en la detección de sinergia entre AC y los  $\beta$ -lactámicos ensayados.

Nuestros resultados sugieren que el mecanismo principal de resistencia de *A. baumannii* a C3G, se debería a la producción de enzimas del grupo AmpC; ya que sólo en un bajo porcentaje de los aislados se evidenció la producción de BLEE.

Debe enfatizarse que la sola descripción de BLEE en algunos aislados de *A. baumannii* -conocida la serie de otros múltiples mecanismos de resistencia- enfatiza el rol de *A. baumannii* como un patógeno cuya importancia en la epidemiología hospitalaria podría ser determinada más bien por su resistencia que por su virulencia, como ya ha sido sugerida por otros autores<sup>32,33</sup>.

### Resumen

La resistencia de *Acinetobacter baumannii* a antimicrobianos  $\beta$ -lactámicos se debe fundamentalmente a la síntesis de  $\beta$ -lactamasas. Del punto de vista clínico se considera que esta bacteria, y otras agrupadas en el acrónimo SPACE (*Serratia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter*), son predominantemente productoras de  $\beta$ -lactamasas tipo AmpC. No hay información en nuestro país sobre presencia de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en *Acinetobacter*. Se estudió la producción de BLEE en cepas de *Acinetobacter*, mediante una modificación de la técnica de Ho y col adicionando cloxacilina como inhibidor de  $\beta$ -lactamasas cromosomales. De 69 cepas con resistencia al menos a una cefalosporina de tercera generación, sólo siete presentaron sinergia positiva. Cuatro cepas amplificaron por RPC un fragmento intragénico de genes de familia TEM y una de ellas amplificó, además, para el gen de la familia OXA. Se evidenció un bajo porcentaje de producción de BLEE, lo que confirma que la producción de Amp-C es el principal mecanismo de resistencia de *A. baumannii* a  $\beta$ -lactámicos. Sin embargo, la descripción de BLEE en esta bacteria, enfatiza su capacidad de albergar múltiples mecanismos de resistencia.

### Referencias

- 1.- Fisher J F, Meroueh S O, Mobashery S. Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity. *Chem Rev* 2005; 105: 395-424.
- 2.- Jacoby G A, Muñoz Price L S. The new  $\beta$ -lactamasas. *N Engl J Med* 2005; 352: 380-91.
- 3.- Sánchez M, Bello H, Domínguez M, Mella S, Zemelman R, González G. Transferencia de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido desde cepas hospitalarias de *Klebsiella pneumoniae* a otras especies de enterobacterias. *Rev Méd Chile* 2006; 134: 415-20.
- 4.- Bush K, Jacoby G A, Medeiros A A. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamasas and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1211-33.
- 5.- Sanders C C.  $\beta$ -lactamasas of Gram negative bacteria: new challenges for new



- drugs. Clin Infect Dis 1992; 1089-99.
- 6.- Jenkins S G. Mechanisms of bacteria antibiotic resistance. New Horizons 1996; 4: 321-32.
  - 7.- Yang Y, Bhachech N, Bradford P, Jett B D, Sahn D F, Bush K. Ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates producing TEM-10 and TEM-43  $\beta$ -lactamases from St. Louis, Missouri. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 1671-6.
  - 8.- Spanu T, Luzzaro F, Perilli M, Amicosante G, Toniolo A, Fadda G. The Italian ESBL Study Group. Occurrence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae* in Italy: Implications for resistance to  $\beta$ -lactams and other antimicrobial drugs. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 196-202.
  - 9.- Bradford PA. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21<sup>st</sup> century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev 2001; 14: 933-51.
  - 10.- Hooper D C. Efflux pumps and nosocomial antibiotic resistance: A primer for hospital epidemiologists. Clin Infect Dis 2005; 40: 1811-7.
  - 11.- Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. J Antimicrob Chemother 2005; 56: 20-51.
  - 12.- Nitzan Y, Deutsch E B, Pechatnikov I. Diffusion of  $\beta$ -lactam antibiotics through oligomeric or monomeric porin channels of some Gram-negative bacteria. Curr Microbiol 2002; 45: 446-55.
  - 13.- Philippon A, Arlet G, Jacoby G A. Plasmid-determined AmpC-type  $\beta$ -lactamases. Antimicrob Agents Chemotherapy 2002; 46: 1-11.
  - 14.- Bello H, Trabal N, Ibáñez D, Reyes A, Domínguez M, Mella S et al.  $\beta$ -lactamasas de familias diferentes a TEM y SHV en cepas de *Klebsiella pneumoniae* subespecie *pneumoniae* aisladas en hospitales chilenos. Rev Méd Chile 2005; 133: 737-9.
  - 15.- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing; Thirteenth Informational Supplement. NCCLS document M100-S13 (M2). NCCLS, Wayne, Pennsylvania, USA, 2003.
  - 16.- Ho P L, Chow K H, Yuen K Y, Ng W S, Chau P Y. Comparison of a novel, inhibitor-potentiated disc-diffusion test with other methods for the detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. J Antimicrob Chemother 1998; 42: 49-54.
  - 17.- O'Callaghan C H, Morris A, Kirby M S, Shingler A H. Novel method for detection of  $\beta$ -lactamase by using a chromogenic-cephalosporins substrate. Antimicrob Agents Chemother 1972; 1: 283-8.
  - 18.- Tenover F C, Huang M B, Rasheed J K, Persing D H. Development of PCR assays to detect ampicillin resistance genes in cerebrospinal fluid samples containing *Haemophilus influenzae*. J Clin Microbiol 1994; 32: 2729-37.
  - 19.- Nüesch-Inderbinen M T, Hachler H, Kayser F H. Detection of genes coding for extended-spectrum SHV  $\beta$ -lactamases in clinical isolates by a molecular genetic method, and comparison with the E-test. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1996; 15: 398-402.
  - 20.- Vahaboglu H, Ozturk R, Aygun G, Coskuncan F, Yaman A, Kaygusuz A, et al. Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 2265-9.
  - 21.- Vahaboglu H, Ozturk R, Akbal H, Saribas S, Tansel O, Coskuncan F. Practical approach for detection and identification of OXA-10-derived ceftazidime-hydrolyzing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. J Clin Microbiol 1998; 36: 827-9.
  - 22.- Joly-Guillou M L. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. Clin Microbiol Infect 2005; 11: 868-73.
  - 23.- Bello H, González G, Domínguez M, Zemelman R, García A, Mella S. Activity of selected  $\beta$ -lactams, ciprofloxacin and amikacin against different *Acinetobacter baumannii* biotypes from Chilean hospitals. Diagn Microbiol Infect Dis 1997; 28: 183-6.
  - 24.- Amyes S G B, Young H K. Mechanisms of antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp genetics of resistance. Bergogne-Bérézin E, Joly-Guillou M L, Towner K J, editors. *Acinetobacter*, microbiology, epidemiology, infections, management. CRC Press, Boca Raton, Fla; 1996, p. 185-224.
  - 25.- Poirel L, Karim A, Mercat A, Le Thomas I, Vahaboglu H, Richard C, et al. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing strain of *Acinetobacter baumannii* isolated from a patient in France. J Antimicrob Chemother 1999; 43: 157-8.
  - 26.- Poirel L, Menuteau O, Agoli N, Cattoen C, Nordmann P. Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. J Clin Microbiol 2003; 41: 3542-7.
  - 27.- Clinical Laboratory Standard Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement. CLSI document M100-S15. CLSI, Wayne, Pennsylvania, USA, 2005.
  - 28.- Trupia LA, Mollerach A, Di Conza JA, Radice M, Mugna V, Méndez E, et al. Comparación de tres métodos microbiológicos para la detección de betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias aisladas en Santa Fe (Argentina). Enferm Infecc Microbiol Clin 2005; 23: 525-8.
  - 29.- Bello H, González G, Domínguez M, Valenzuela L, Zemelman C, Mella S, et al. Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases produced by Chilean isolates of *Klebsiella pneumoniae* by two synergy methods. J Chemother 2004; 16: 312-4.
  - 30.- Pasteran F, Rapoport M, Petroni A, Faccone D, Corso A, Galas M, et al. Emergence of PER-2 and VEB-1a in *Acinetobacter baumannii* strains in the Americas. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50: 3222-4.
  - 31.- Nagano N, Nagano Y, Cordevant C, Shibata N, Arakawa Y. Nosocomial transmission of CTX-M-2  $\beta$ -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* in a neurosurgery ward. J Clin Microbiol 2004; 42: 3978-84.
  - 32.- Courvalin P. Evasion of antibiotic action by bacteria. J Antimicrob Chemother 1996; 37: 855-69.
  - 33.- Diomedi A. Infecciones por *Acinetobacter baumannii* pan-resistente. Consideraciones epidemiológicas y de manejo antimicrobiano actualizado. Rev Chil Infect 2005; 22: 298-320.