

Resistencia a aminoglucósidos por los genes *aph(3')-VIa* y *aac(3')-II* en *Acinetobacter baumannii* aislados en Montería, Colombia

Aminoglycoside resistance by *aph(3')-VIa* and *aac(3')-II* genes in *Acinetobacter baumannii* isolated in Montería, Colombia

Pedro Martínez Ramos¹, Salim Máttar Velilla²

Resumen

Objetivo: Investigar la resistencia a aminoglucósidos en cepas de *A. baumannii* por expresión de genes *aph(3')-VIa* y *aac(3')-II*, de una clínica privada en Montería.

Materiales y Métodos: Entre agosto de 2005 y febrero de 2007 se recolectaron 17 aislamientos de *A. baumannii* resistentes a aminoglucosidos de una clínica privada de tercer nivel de Montería. Se determinó la susceptibilidad antimicrobiana mediante la concentración mínima inhibitoria. Se amplificaron y secuenciaron los genes *aph(3')-VIa*, *aph(3')-Ia*, *aac(3)-I*, *aac(3)-II* y *aac(6)-Ia*. El análisis de las secuencias se realizó con la base de datos GenBank y el motor de búsqueda BLASTX. El ADN de todos los aislamientos fue preparado en bloques de agarosa y digerido con *ApaI*.

Resultados: 16 de 17 aislamientos (94,1%) resistentes a amikacina fueron positivos para el gen *aph(3')-VIa* y todos los aislamientos fueron positivos para *aac(3')-II*, ningún aislamiento resulto positivo para los genes *aac(3')-I*, *aph(3')-Ia* y *aac(6')-I*. La PFGE mostró 8 pulsotipos con dos clones en 11 aislamientos, distribuidos en 7 aislamientos pulsotipo I y 4 aislamientos pulsotipo II. Los otros 6 pulsotipos comprendieron aislamientos no relacionados.

Conclusión: La resistencia a los aminoglucósidos en *A. baumannii* esta codificada principalmente por el gen *aph(3')-VIa* y el gen *aac(3')-II*. El análisis epidemiológico molecular demostró que la resistencia a amikacina se debe a la diseminación del gen *aph(3')-VIa* en aislamientos de *A. baumannii* que en muchos casos como el de este estudio causa brotes.

Palabras clave: Patógeno nosocomial, resistencia antimicrobial, PFGE.

Fecha de recepción: 3 de enero de 2012
Fecha de aceptación: 27 de marzo de 2012

¹ Profesor titular, Departamento de Medicina, Universidad de Córdoba, (Colombia).

² Profesor titular, Departamento de Medicina, Universidad de Córdoba, (Colombia).

Correspondencia: Salim Máttar. Profesor titular de microbiología. Universidad de Córdoba. Instituto de Investigaciones Biológicas del Trópico (IIBT). Montería, (Córdoba), Colombia. Tel/fax: 57-47-560710. E-mail: mattarsalim@hotmail.com

Abstract

Objetivo: Investigate aminoglycoside-resistant *A. baumannii* strain by expressing *aph(3')-VIa* y *aac(3')-II* genes, in a clinic from Monteria.

Materials and Methods: Between august 2005 and february 2007 were collected 17 isolates of *A. baumannii* resistant to aminoglycosides at a private clinic providing tertiary care in Monteria. Antimicrobial susceptibility was determined by minimum inhibitory concentration. Were amplified and sequenced the genes *aph(3')-VIa*, *aph(3')-Ia*, *aac(3')-I*, *aac(3')-II* y *aac(6')-Ia*. The sequence analysis was performed with the GenBank database and BLASTX search engine. DNA of all isolates were prepared in agarose blocks and digested with the restriction enzyme *ApaI*.

Results: 16 of 17 isolates (94,1%) resistant to amikacin were positive for the gene *aph(3')-VIa* and all isolates were positive for *aac(3')-II*, no isolates were positive for the gene *aac(3')-I*, *aph(3')-Ia* and *aac(6')-I*. The PFGE pulsotypes showed 8 with two clones in 11 isolates, distributed in 7 isolates pulsotypes and 4 isolates pulsotypes II. The other 6 pulsotypes included isolates unrelated.

Conclusion: resistance to aminoglycosides in *A. baumannii* is primarily coded by the gene *aph(3')-VIa* gene and the *aac(3')-II*. Molecular epidemiological analysis showed that resistance to amikacin is due to the large spread of the gene *aph(3')-VIa* in *A. baumannii* isolates that in many cases as in this study cause outbreaks.

Keyword: Nosocomial pathogens, Antimicrobial resistance, PFGE.

INTRODUCCIÓN

Acinetobacter baumannii es un importante patógeno nosocomial especialmente en unidades de cuidados intensivos (UCIs), que causa infecciones respiratorias, urinarias y bacteriemias difíciles de tratar por la multirresistencia de este microorganismos a los antibióticos (1). *Acinetobacter baumannii* es naturalmente resistente a las cefalosporinas por la codificación cromosomal de enzimas ADC (2). La multirresistencia en esta especie esta dada principalmente por la presencia de elementos móviles como transposones, integrones y plásmidos que pueden ser fácilmente adquiridos de otros microorganismos como *E. coli*, pero el proceso opuesto de transferencia en la mayoría de los casos no ocurre (3,4).

La resistencia a aminoglucósidos en *A. baumannii* es causada por la modificación de grupos hidroxilos o aminos de estos antibióticos (5), debido a enzimas como la

APH(3')-I, -II, AAC(3')-II, AAC(3)-I, AAC(6')-I y ANT(2'')-I, identificadas en este género y responsables de la resistencia a gentamicina, tobramicina, kanamicina y otros aminoglucósidos (6,7). De otra parte, mecanismos de resistencia a estos antibióticos por disminución de la permeabilidad o alteración de los sitios de unión se han sugerido (8). No obstante, amikacina sigue siendo el más activo aminoglucósidos usado para el tratamiento de las infecciones causadas por *Acinetobacter* spp. Aunque la enzima *aac(6')-I* que se encuentra en *Acinetobacter* spp., puede inactivar amikacina, es la enzima *aph(3')-VIa* la que más frecuentemente se asocia con la resistencia a la amikacina en *A. baumannii* (2,6).

De otra parte, brotes de infección nosocomial causados por *Acinetobacter baumannii* resistentes a amikacina se han documentado (9). El objetivo de este trabajo fue investigar la resistencia a aminoglucósidos en cepas de *A. baumannii* por expresión de

genes *aph(3')-VIa* y *aac(3')-II*, de una clínica privada en Montería, Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas. Diecisiete aislamientos clínicos de *A. baumannii* resistentes a amikacina fueron recolectados de una clínica privada en Montería entre agosto de 2005 y febrero de 2007. La identificación de *A. baumannii* se basó en las reacciones bioquímicas por MicroScan® Neg Combo Panel Type 44 (Dade Behring, Ca, USA). La identificación de *A. baumannii* se llevó a cabo usando MicroScan® Neg Combo Panel Type 44 (Dade Behring, Ca, USA). El gen β -lactamasa bla_{OXA51} característico de *A. baumannii* estuvo presente en todos los aislamientos (10). Los aislamientos se obtuvieron de diferentes muestras clínicas en una clínica privada de Montería y se mantuvieron a -70°C, en Skim-milk. Los aislamientos fueron obtenidos de la unidad de cuidados intensivos adultos (n=13) y unidad de cuidados intensivos neonatal (n=4), las muestras clínicas de las que se aislaron fueron (secreciones respiratorias n=10, secreciones de heridas n= 3, líquido peritoneal n= 2, catéter n=1, y orina n=1). Los microragnismos se mantuvieron a -70°C, en Skim-milk antes del análisis molecular.

Determinación de la CMI. Se determinaron los patrones de resistencia mediante el método de concentración mínima inhibitoria (CMI), según las normas del CLSI (11). Los agentes antibacterianos utilizados fueron: imipenem, meropenem, ceftazidime, cefepime, aztreonam, amikacina, gentamicina, ciprofloxacina, moxifloxacina, ampicilina/sulbactam y piperacilina/tazobactam. *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 fueron usados como controles.

PCR y secuenciación del ADN. Los oligonucleótidos usados para amplificar los genes *aph(3')-VIa*, *aph(3')-Ia*, *aac(3)-I*, *aac(3)-II* y *aac(6)-Ia*, se muestran en la tabla 1. La detección de productos ADN se realizó por tinción del gel con bromuro de etidio (0,5 mg/L) y posterior visualización en un fotodocumentador GE healthcare (ImageQuant 100, Uppsala, Sweden).

Para confirmar los productos amplificados los fragmentos fueron purificados con el Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, y se secuenciaron directamente mediante el método dideoxi en un secuenciador automático de ADN MegaBACE 750 (Amersham, Biosciences).

El análisis de las secuencias se realizó con la base de datos GenBank del Centro Nacional de Información sobre Biotecnología y el motor de búsqueda BLASTX (12). Genes relacionados y la secuencia de nucleótidos se analizaron mediante el uso de múltiple alineación creada por el uso de Clustal W versión 2.0.8 (13).

Tabla 1. Secuencia nucleotídica de los oligonucleótidos utilizados en el estudio.

Oligonucleótidos	Secuencia (5' 3')	Ref
APH(3')-VIaF APH(3')-VIaR	ATACAGAGACCACCATACAGT GGACAATCAATAATAGCAAT	9
APH(3')-IaF APH(3')-IaR	ATGGGCTCGCGATAATGTC CTCACCAGGCGAGTTCCAT	14
AAC(3)-IaF AAC(3)-IaR	ACCTACTCCCAACATCAGCC ATATAGATCTCACTACGCGC	15
AAC(3)-IIF AAC(3)-IIR	ACTGTGATGGGATACGCGTC CTCCGTCAGCGTTTCAGCTA	14
AAC(6')-IaF AAC(6')-IaR	ATGAATTATCAAATTGTG TACTC'ITGATTAAACT	16

Fuente: Datos tabulados por los autores

PFGE. El ADN de todos los aislamientos fue preparado en bloques de agarosa y digerido con 30U de la enzima de restricción ApaI (Promega), de acuerdo al protocolo de Seifert et al (17). La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1% (Seakem Gold Agarose, Cambrex, USA) en buffer TBE 0,5M en un orthogonal-field alternating gel electrophoresis Gene Navigator (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden) durante 20 horas a 12°C, las condiciones de corrido fueron 200 V con un ángulo de pulso de 120° y pulsos de tiempo de tres fases: 20s por 8h, 10s por 8h y 5s por 4h. Como control de tamaño molecular se utilizó el marcador λ ladder (New England, Biolabs) y las bandas fueron teñidas con bromuro de etidio (0,5 mg/lit) y posterior visualización en un fotodocumentador GE healthcare (ImageQuant 100, Uppsala, Sweden). La interpretación de los perfiles PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis) se realizó de acuerdo con los criterios de Tenover et al. (18).

RESULTADOS

Genes de resistencia a aminoglucósidos.

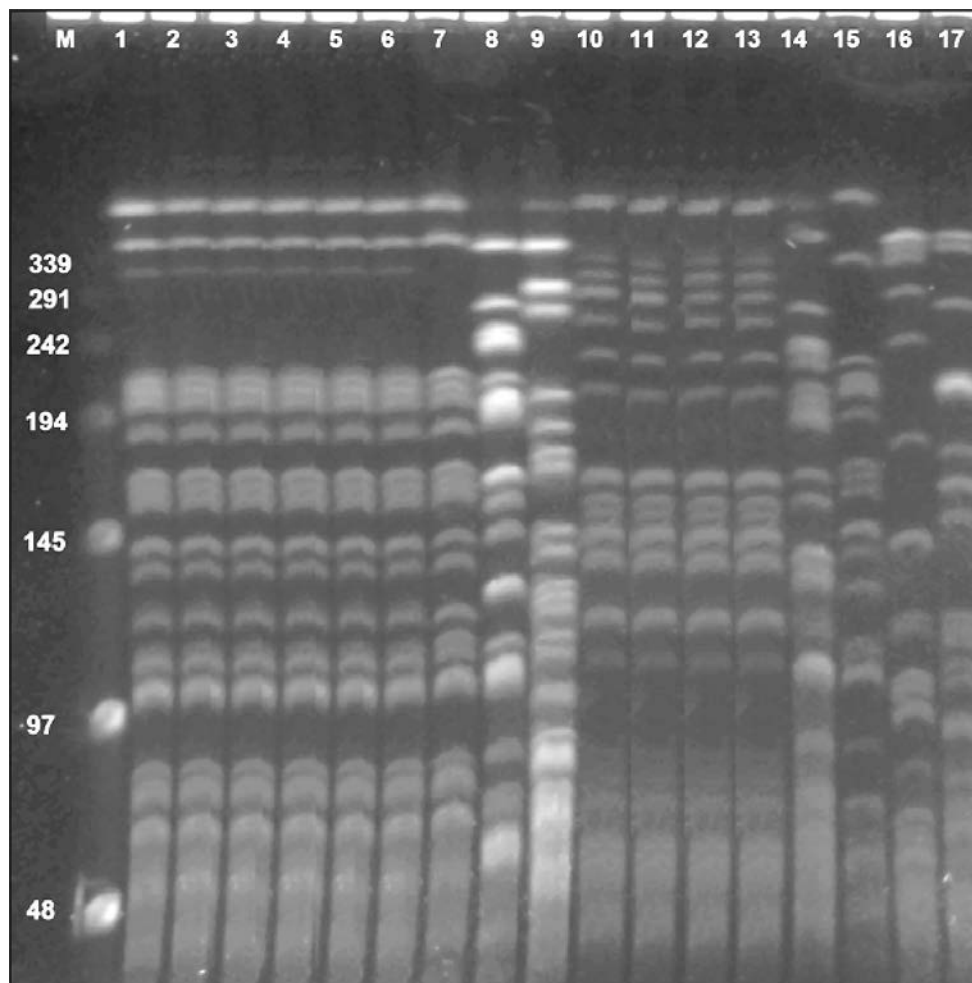
Diecisiete aislamientos fueron resistentes a amikacina. Todos fueron positivos para el gen *aac(3)-II* y 16 lo fueron para el gen *aph(3')-VIa* (Tabla 2). Ningún aislamiento resultó positivo para el gen *aph(3')-Ia*, *aac(3)-Ia* y *aac(6')-Ia*. La secuenciación del fragmento amplificado del gen *aac(3)-II* mostro 100% de homología con este gen (código de acceso EMBL no. GU253893), de igual forma la secuencia nucleotídica del producto gen *aph(3')-VIa* mostro 100% de homología con este gen (código de acceso EMBL no. GQ453406).

Tipificación molecular. Un total de 8 pulsotipos que comprendieron aislamientos genéticamente idénticos y no relacionados fueron observados por PFGE. El pulsotipo I fue el predominante con 7 aislamientos idénticos en diferentes periodos durante el estudio, seguido por el pulsotipo II con 4 aislamientos. Los otros seis pulsotipos comprendieron aislamientos no relacionados (tabla 2; figura 1).

Tabla 2. Características fenotípicas y genotípicas de los aislamientos resistentes a aminoglucósidos.

No. aislamiento	Servicio clínico	MIC (μ g/ml)			<i>aac(3)-II</i>	<i>aph(3')-VIa</i>	Pulsotipo
		AK	CN	TO			
1	UCI	> 32	> 8	> 8	+	+	I
2	UCI	> 32	> 8	> 8	+	+	I
3	UCI	32	> 8	> 8	+	+	I
4	UCI	> 32	> 8	> 8	+	+	I
5	UCIN	32	> 8	> 8	+	-	I
6	UCI	> 32	> 8	> 8	+	+	I
7	UCI	> 32	> 8	> 8	+	+	I
10	UCIN	> 32	> 8	> 8	+	+	II
11	UCIN	> 32	> 8	> 8	+	+	II
12	UCI	> 32	> 8	> 8	+	+	II
13	UCI	> 32	> 8	> 8	+	+	II
8	UCI	> 32	> 8	> 8	+	+	III
9	UCI	> 32	> 8	> 8	+	+	IV
14	UCI	> 32	> 8	> 8	+	+	V
15	UCIN	> 32	> 8	> 8	+	+	VI
16	UCI	> 32	> 8	> 8	+	+	VII
17	UCI	> 32	> 8	> 8	+	+	VIII

AK: Amikacina; CN: Gentamicina; TO: Tobramicina. **Fuente:** Datos tabulados por los autores



Fuente: Propia de los autores

Figura 1. PFGE de 17 aislamientos de *A. baumannii* digeridos con *Apal*, líneas 1-17. Línea M. Marcador lambda ADN con peso molecular en Kb.

La distribución de los aislamientos clínicos de *A. baumannii* fue exclusiva de los servicios de UCIs, siendo las muestras respiratorias las muestras biológicas más comunes que contenían *A. baumannii*.

DISCUSIÓN

La resistencia a los aminoglucósidos es a menudo mediada por enzimas modificantes de aminoglucósidos (EMAs) que son clasificadas por el mecanismo de su modi-

ficación y el sitio en el antibiótico que estas modifican (1). En bacterias patógenas, tres tipos de 3'-fosfotransferasas se pueden distinguir, en particular sobre la base de su sustrato in vitro (1). De los 17 aislamientos resistentes a amikacina 15 mostraron CMI >32 µg/ml, y 16 coincidieron con la presencia del gen *aph(3')-VI*a (Tabla 2).

Aunque, parece ser que el gen *aph(3')-VI*a es el único responsable de conferir resistencia a la amikacina en *Acinetobacter* spp., y que

con menor frecuencia se observa en otras bacterias gram-negativas (19), se incluyeron para su estudio otros genes como el aph(3')-Ia, aac(3)-Ia, el aac(3')-II y el aac(6')-Ia para los cuales su papel de conferir resistencia a amikacina es poco claro. Sin embargo, estos genes son importantes en su papel de codificar resistencia a la gentamicina y otros aminoglucósidos como la tobramicina y kanamicina debido a que pueden ser transportados por integrones como genes cassettes a los que les hace falta su propio promotor, por lo que su expresión podría estar determinada de su cercanía al promotor del segmento conservado 5' (20).

La producción de enzima APH(3')-VI esta caracterizada por la expresión de resistencia a kanamicina, neomicina, paromomicina, ribostamicina, butirosina, y gentamicina, como también a amikacina y isepamicina (21). No obstante, el factor determinante de la resistencia del gen aph(3')-VIa se ha sugerido que podría estar asociado a un transposon (10). Estos genes pueden ser transferidos fácilmente entre las cepas portadoras de estos elementos genéticos, lo que contribuye a la diseminación de la resistencia a amikacina.

La PCR permitió detectar específicamente que el 94,1% de los aislamientos clínicos de *A. baumannii* resistentes a amikacina portan el gen aph(3')-VIa. Estos resultados son similares a los obtenidos por Shaw et al (19), quienes encontraron que el 95% de las cepas resistentes a amikacina hibridaron con una sonda aph(3')-VIa. Estos resultados también son similares a lo encontrado por Lambert et al (21), quienes establecieron que en Francia la diseminación de resistencia a amikacina en *Acinetobacter* spp., se debió a este mismo gen.

De otra parte, en España, Vila et al (9), reportaron que la diseminación de resistencia a amikacina estaba dada por clones los cuales portaban el gen aph(3')-VIa. Esto muestra como una cepa de *A. baumannii* que contenga el gen aph(3')-VIa puede convertirse en un importante problema hospitalario que alcance la dimensión de brote. No obstante, resultados similares a los de Vila et al (9), fueron obtenidos en este trabajo en el que se encontraron que dos clones de *A. baumannii* resistente a amikacina y portadores del gen aph(3')-VIa se diseminaron entre la UCI adulto y la UCI neonatal de esta institución (tabla 2; figura 1). De esta forma, los brotes causados por *A. baumannii* resistentes a amikacina, y el uso de antibióticos aminoglucósidos puede contribuir a la persistencia y diseminación de los genes responsables de la resistencia (22). Sin embargo, en ocasiones los pacientes sólo están colonizados y no requieren terapia antimicrobiana, por lo que es importante distinguir entre colonización e infección antes de iniciar la terapia antimicrobiana. No obstante, en este estudio la tipificación molecular por PFGE mostró dos clones que involucraron 11 aislamientos (64,7%). El clon I fue idénticamente mostrado por 7 aislamientos obtenidos de la UCI adultos (6 aislamientos), y UCI neonatal (1 aislamiento).

El clon II fue observado en 3 aislamientos obtenidos de la UCI neonatal y 1 de la UCI adultos. Los otros seis aislamientos fueron clonalmente no relacionados. Aunque brotes nosocomiales causados por un aislamiento clonal común se han reportado (7), el estudio sugiere que estas cepas estuvieron presentes con anterioridad en esta institución hospitalaria y, por tanto, reflejan una situación endémica con un enorme desafío para el tratamiento eficaz de las infecciones

nosocomiales por *A. baumannii*. En este sentido, los resultados obtenidos en este estudio muestran que el uso de gentamicina o kanamicina para tratar infecciones causadas por *A. baumannii* no deben considerarse teniendo en cuenta que los genes *aph(3')-VI*a y *aac(3)-II* que confieren resistencia a estos antibióticos fueron detectados en todos los aislamientos obtenidos, más aún, que algunos aislamientos mostraron ser genéticamente idénticos, lo que sugiere la diseminación de estos genes como parte de plásmidos de resistencia o integrones entre cepas clonales y no clonales. Lo cual conllevaría al fracaso terapéutico si gentamicina o kanamicina son utilizados para tratar infecciones causadas por este microorganismo.

Aunque, el uso de los aminoglucósidos como monoterapia contra las infecciones causadas por *A. baumannii* se ha debatido por la toxicidad que producen frente a otros antibióticos, y que siempre se han utilizado como parte de terapia combinada con un β -lactámico, un estudio de Gounden et al. (23), mostraron no haber diferencia significativa en cuanto al uso de tobramicina Vs colistina, asociado a la mortalidad en la unidad de cuidados intensivos, aumento en los niveles de creatinina sérica o el tiempo de eliminación microbiológica. Sin embargo, la resistencia a antibióticos del grupo de los aminoglucósidos (amikacina, gentamicina y tobramicina), que parecen mantener la actividad frente a cepas de *A. baumannii*, es cada vez mayor y muchas veces las pruebas de sensibilidad en especial la de los métodos automatizados no garantizan la actividad antimicrobiana de estos por la generación de discordancia en los resultados, lo que causa preocupación en cuanto a la actividad de los aminoglucósidos contra *A. baumannii*, y los genes que podrían estar

involucrados en la expresión de resistencia (24).

En conclusión este estudio permite sugerir que la resistencia a los aminoglucósidos en *A. baumannii* esta codificada principalmente por el gen *aph(3')-VI*a y el gen *aac(3')-II*. Además, el análisis epidemiológico molecular de los aislamientos mostró que la resistencia a amikacina se debe a la gran diseminación del gen *aph(3')-VI*a en aislamientos de *A. baumannii* que en muchos casos como en el de este estudio causan brotes.

Financiación: Este trabajo fue financiado por la Universidad de Córdoba en el marco del proyecto: Integrones y multiresistencia asociada en cepas de *Escherichia coli* y *Acinetobacter baumannii* aisladas de humanos y animales de la ciudad de Montería", según código FMV 04-06; N°: 1120223.

Conflicto de interés: Ninguno

REFERENCIAS

- (1) Lambert T, Gerbaud G, Courvalin P. Transferable Amikacin Resistance in *Acinetobacter* spp. Due to a New Type of 3'-Aminoglycoside Phosphotransferase. *Antimicrob Agents Chemother* 1988;32(1):15-19.
- (2) Beceiro A, Dominguez L, Ribera A, Vila J, Molina F, Villanueva R, et al. Molecular Characterization of the Gene Encoding a New AmpC β -Lactamase in a Clinical Strain of *Acinetobacter* Genomic Species 3. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(4):1374-1378.
- (3) Yum J, Yi K, Lee H, Yong D, Lee K, Kim J, et al. Molecular characterization of metallo- β -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomospecies 3 from Korea: identification of two new integrons carrying the *bla* (VIM-2) gene cassettes. *J Antimicrob Chemother* 2002;49(5):837-840.

- (4) De Vries J, Wackernagel D. Integration of foreign DNA during natural transformation of *Acinetobacter* sp. by homology-facilitated illegitimate recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(4):2094–2099.
- (5) Shmara A, Weinsetel N, Dery K, Chavideh R, Tolmasky M. Systematic analysis of a conserved region of the aminoglycoside 6'-Nacetyltransferase type Ib. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(12):3287-3292.
- (6) Cho Y, Moon D, Jin J, Choi C, Lee Y, Lee J. Genetic basis of resistance to aminoglycosides in *Acinetobacter* spp. and spread of *armA* in *Acinetobacter baumannii* sequence group 1 in Korean hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009;64(2):185-90.
- (7) Doi Y, Wachino J, Yamane K, Shibata N, Yagi T, Shibayama K, et al. Spread of Novel Aminoglycoside Resistance Gene *aac(6')*-Iad among *Acinetobacter* Clinical Isolates in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(6):2075–80.
- (8) Vila J, Marcos M, Marco F, Abdalla S, Vergara Y, Reig R, et al. In vitro antimicrobial production of β -lactamases, aminoglycoside-modifying enzymes, and chloramphenicol acetyltransferase by and susceptibility of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37(1):138-41.
- (9) Vila J, Ruiz J, Navia M, Becerril B, Garcia I, Perea S, et al. Spread of Amikacin Resistance in *Acinetobacter baumannii* Strains Isolated in Spain Due to an Epidemic Strain. *J Clin Microbiol* 1999;37(3):758-761.
- (10) Turton J, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann M, Pitt T. Identification of *Acinetobacter baumannii* by Detection of the *bla*OXA-51-like Carbapenemase Gene Intrinsic to This Species. *J Clin Microbiol* 2006;44(8):2974–6.
- (11) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Informational. Eighth ed. Approved standard M7-A8. Wayne, PA, EE.UU. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009.
- (12) Altschul S, Gish W, Miller W, Myers E, Lipman D. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990;215(3):403-10.
- (13) Thompson J, Higgins D, Gibson T. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994;22(22):4673-80.
- (14) Maynard C, Fairbrother J, Bekal S, Sanschagrín F, Levesque R, Brousseau R, et al. Antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* O149:K91 isolates obtained over a 23-year period from pigs. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47(10):3214–21.
- (15) Van de Klundert J, Vliegenthart J. PCR detection of genes coding for aminoglycoside-modifying enzymes. In Persing D, Smith F, Tenover F, White T. *Diagnostic molecular microbiology*. Washington, D.C. American Society for Microbiology. 1993;p547–52.
- (16) Ploy M, Giamarellou H, Bourlioux P, Courvalin P, Lambert T. Detection of *aac(6')*-I Genes in Amikacin-Resistant *Acinetobacter* spp. by PCR. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38(12):2925-2928.
- (17) Seifert H, Dolzani L, Bressan R, Reijden T, Strijen B, Stefanik D, et al. Standardization and Interlaboratory Reproducibility Assessment of Pulsed-Field Gel Electrophoresis-Generated Fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 2005;43(9):4328-35.
- (18) Tenover F, Arbeit R, Goering R, Mickelsen P, Murray B, Persing D, et al. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. *J Clin Microbiol* 1995;33(9):2233-9.
- (19) Shaw K, Rather P, Hare R, Miller G. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the ami-

- noglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev* 1993;57(1):138-63.
- (20) Nemeč A, Dolzani L, Brisse S, van den Broek P, Dijkshoorn L. Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-European *Acinetobacter baumannii* clones. *J Med Microbiol* 2004;53(12):1233-40.
- (21) Lambert T, Gerbaud G, Bouvet P, Vieu J, Courvalin P. Dissemination of amikacin resistance gene *aphA6* in *Acinetobacter* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34(6):1244-8.
- (22) Fishbain J, Peleg A. Treatment of *Acinetobacter* Infections. *Clinical Infectious Diseases* 2010;51(1):79-84.
- (23) Gounden R, Bamford C, van Zyl-Smit R, Cohen K, Maartens G. Safety and effectiveness of colistin compared with tobramycin for multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *BMC Infect Dis* 2009;9(1):26
- (24). Akers K, Chaney C, Barsoumian A, Beckius M, Zera W, Yu X, et al. Aminoglycoside resistance and susceptibility testing errors in *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex. *J Clin Microbiol* 2010;48(4):1132-1138