

Mehanizmi rezistencije na karbapeneme u *Acinetobacter baumannii*

Ivana GOIĆ-BARIŠIĆ, dr. sc., dr. med.,
specijalist mikrobiolog

Klinički bolnički centar Split
Odjel za mikrobiologiju i parazitologiju
Spinčićeva 1, Split

Pregledni rad

Pripadnici roda *Acinetobacter* su nefermentativni mikroorganizmi široko rasprostranjeni u vodi i na zemlji. Pojedine vrste unutar roda sastavni su dio fiziološke flore kože i sluznica te su sposobni preživjeti duži vremenski period na suhim i vlažnim površinama. *Acinetobacter baumannii* je oportunistički uzročnik hospitalnih infekcija, prvenstveno u imunokompromitiranih bolesnika. Sve do 1970-ih godina, većina izolata unutar roda *Acinetobacter* bila je osjetljiva na široki spektar različitih antibiotika. Razvoj rezistencije na karbapeneme novijeg je datuma i posljedica je stvaranja metalo- β -laktamaza (karbapenemaza), oksacilinaza koje imaju sposobnost hidrolize karbapenema, gubitka proteina u vanjskoj membrani, izbacivanja antibiotika iz stanice ili kombinacije navedenih mehanizama rezistencije. Smatra se da su karbapenemaze i oksacilinaze koje hidroliziraju karbapeneme najznačajni u ekspresiji rezistencije na karbapeneme u kliničkih izolata *A. baumannii*. Enzimi koji imaju sposobnost hidrolize karbapenema u kliničkim izolatima *A. baumannii* pripadaju molekularnoj klasi D (OXA enzimi, oksacilinaze) ili molekularnoj klasi B (metaloenzimi iz grupe IMP, VIM i SIM karbapenemaza). Veliko kliničko značenje danas imaju oksacilinaze koje se dijele u četiri filogenetske skupine specifične za izolate *A. baumannii*: OXA-23 skupina, OXA-40 skupina, OXA-58 skupina i najveća OXA-51 skupina, poznata i kao prirodno kromosomski kodirane oksacilinaze. OXA-51 skupina oksacilinaza uglavnom ima slabu sposobnost hidrolize karbapenema, ali prisustvo insercijske sekvencije *ISAbal1* smještene neposredno uz *bla_{OXA-51 like}* gen djeluje kao promotor rezistencije ili smanjene osjetljivosti na karbapeneme. Zabrinjavajući porast rezistencije na karbapeneme zabilježen je posljednjih godina među izolatima *A. baumannii* u nekoliko bolnica u Hrvatskoj. Molekularna osnova smanjene osjetljivosti na karbapeneme istražena je na velikom broju izolata iz KBC Split, a šesnaest izolata uključeno je i u međunarodni ARPAC (Antibiotic Resistance, Prevention and Control) projekt. Genotipizacija pomoću dvije metode (RAPD i PFGE) potvrdila je pripadnost hrvatskih izolata Europskom klonu I (sekvencijska grupa 2).

Mechanisms of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*

Review article

Organisms of the genus *Acinetobacter* are ubiquitous and widely distributed in soil and water. They are frequently present on human skin and mucous membranes and are able to survive for long periods on dry and humid surfaces. *Acinetobacter baumannii* is an opportunistic pathogen that is mostly involved in nosocomial infections in immunocompromised patients. Until the 1970s, most isolates were susceptible to a wide range of antibiotics. Carbapenem resistance results from production of metallo- β -lactamases, carbapenem hydrolyzing oxacillinases, loss of outer membrane proteins, efflux and often combined mechanisms of resistance. These resistance mechanisms pose a serious therapeutic threat, since carbapenems are frequently used to treat otherwise resistant *A. baumannii* infections. Carbapenemases found in *Acinetobacter* belong to molecular class D (OXA enzymes) or class B (metalloenzymes of IMP- and VIM-type or SIM-1). The OXA carbapenemases are divided into four phylogenetic subgroups: acquired enzymes OXA-23-like, OXA-40-like and OXA-58-like and OXA-51-like enzymes that are intrinsic to *A. baumannii*. OXA-51-like enzymes are normally expressed at low levels but can be over expressed as consequence of the insertion of an *ISAbal1* sequence upstream of their genes.

Ključne riječi

A. baumannii
rezistencija
karbapenemi

Key words

A. baumannii
resistance
carbapenems

Primljeno: 2009-10-06

Received: 2009-10-06

Prihvaćeno: 2009-11-23

Accepted: 2009-11-23

Recently an increase in the prevalence of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* isolates was observed in few medical centers in Croatia. The investigation of the background of carbapenem resistance in relevant clinical isolates of *A. baumannii* from Split University Hospital was performed during last years and sixteen different strains of carbapenem resistant *A. bauman-*

nii were included in ARPAC project (Antibiotic Resistance, Prevention and Control). The molecular typing by random amplified polymorphic DNA analysis (RAPD), followed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) belonged isolates to the same PFGE type as a part of sequence group 2 (European 'clone I' lineage).

Acinetobacter baumannii je postao važan uzročnik bolničkih infekcija prvenstveno zbog naročite sposobnosti preživljavanja i širenja u bolničkom okruženju, te brzog razvoja rezistencije na brojna antimikrobna sredstva. Ovaj mikroorganizam posjeduje sposobnost preživljavanja na suhim površinama i prašini do 10 dana (prosjek za *Staphylococcus aureus* je sedam dana), dok inkapsulirani sojevi mogu preživjeti do četiri mjeseca na plastičnim PVC površinama, keramici, gumenim površinama i čeliku [1], što je posljedica minimalnih prehrambenih zahtjeva potrebnih za rast *Acinetobacter* spp., kao i njegove sposobnosti da raste na različitim temperaturama i pH vrijednostima [2]. Danas ga možemo smatrati ubikvitarnim bolničkim patogenom, te je zasigurno među najčešćim gram-negativnim mikroorganizmima izoliranim s ruku bolničkog osoblja [3]. Njegova sposobnost izmjene (engl. *switch*) genomske strukture u kombinaciji s promjenjivom ekspresijom gena, za posljedicu ima razvoj rezistencije nakon izlaganja antimikrobnim sredstvima [1]. Multiplo rezistentni izolati *A. baumannii* sve su učestaliji u jedinicama intenzivne njege većine europskih država i ozbiljan su problem kliničarima koji liječe bolesnike. Učestalost bolničkih infekcija uzrokovanih *A. baumannii* u jedinicama intenzivnog liječenja u europskim zemljama kreće se od 2% do 10% svih infekcija uzrokovanih gram-negativnim mikroorganizmima, dok u Sjedinjenim Američkim Državama taj postotak iznosi 2,5% [4, 5].

Prvi soj *A. baumannii* rezistentan na karbapeneme izoliran je iz hemokulture bolesnika liječenog 1985. godine u Kraljevskoj bolnici u Edinburgu i označen kao ARI-1 (*Acinetobacter Resistant to Imipenem*) [6]. Razvoj rezistencije na β -laktamske antibiotike gram-negativnih bakterija najčešće je posljedica stvaranja β -laktamaza, enzima koji ih razaraju. Karbapenemi (imipenem, meropenem) kao β -laktamski antibiotici s najširim spektrom djelovanja, dugo vremena su predstavljali terapijsko rješenje za gram-negativne nefermentativne uzročnike. Enzimi koji imaju sposobnost hidrolize karbapenemske jezgre su karbapenemaze i oksacilinaze koje razaraju karbapeneme. Osim posredstvom karbapenemaza i oksacilinaza, otpornost na karbapeneme može biti uzrokovana i smanjenom propusnošću vanjske membrane uslijed gubitka ili promjene porina (engl. OMP – *outer membrane protein*) i proteina (engl. PBP – *penicillin-binding protein*), pojačanim izbacivanjem (engl. *efflux*) karbapenema iz stanice ili kombinacijom ovih mehanizama [7]. Smatra se da su gubitak ili promjena porina, pojačano izbacivanje karbapenema iz stanice ili kombinacije ovih mehanizama rezisten-

cije manje značajni u ekspresiji rezistencije na karbapeneme u kliničkih izolata *A. baumannii*, u odnosu na karbapenemaze i oksacilinaze koje hidroliziraju karbapeneme [8]. Molekularna klasifikacija prema Ambleru na osnovu sekvencije aminokiselina dijeli enzime koji imaju sposobnost hidrolize karbapenema u klasu B (metaloenzimi koji sadrže cink kao kofaktor), te klasu D serinskih estera poznatih kao oksacilinaze [9, 10].

Klasa B prema Ambleru

Do danas je u kliničkim izolatima *A. baumannii* opisano više metalo- β -laktamaza koje mogu hidrolizirati karbapeneme (Ambler klasa B) iz grupe IMP, VIM i SIM karbapenemaza, poglavito u Aziji i zapadnoj Europi. IMP je kratica od engl. *active on imipene*, VIM od engl. *Verona integron-encoded metallo- β -lactamase*, a SIM od engl. *Seoul imipenemase* [11]. To su o cinku ovisne metalo- β -laktamaze kodirane plazmidom ili integronom, koje mogu hidrolizirati sve β -laktame osim monobaktama, i nisu osjetljive na inhibitore β -laktamaza: klavulanat, tazobaktam i sulbaktam [12, 13]. Njihovu enzimsku aktivnost inhibira EDTA (etilen diamin tetraoctena kiselina). Metallo- β -laktamaze IMP-1 grupe opisane su u Italiji [14], Japanu [15], Koreji [16], Velikoj Britaniji [17], IMP-2 u Italiji [18] i Japanu [19], IMP-4 u Hong Kongu [20] i Singapuru [21], IMP-5 u Portugalu [22], IMP-6 u Brazilu [23], te IMP-11 u Japanu [24]. IMP-4 otkrivena je u kliničkim izolatima vrste *Acinetobacter junii* u Australiji [25]. VIM metalo- β -laktamaze rjeđe su zastupljene nego IMP karbapenemaze, a do sada su opisane dvije vrste: VIM-1 u izolatima *A. baumannii* u Grčkoj [26], te VIM-2 karbapenemaza u izolatima iz Južne Koreje [16]. Na istim zemljopisnim prostorima također je otkrivena i jedina karbapenemaza SIM grupe, označena kao SIM-1 [27].

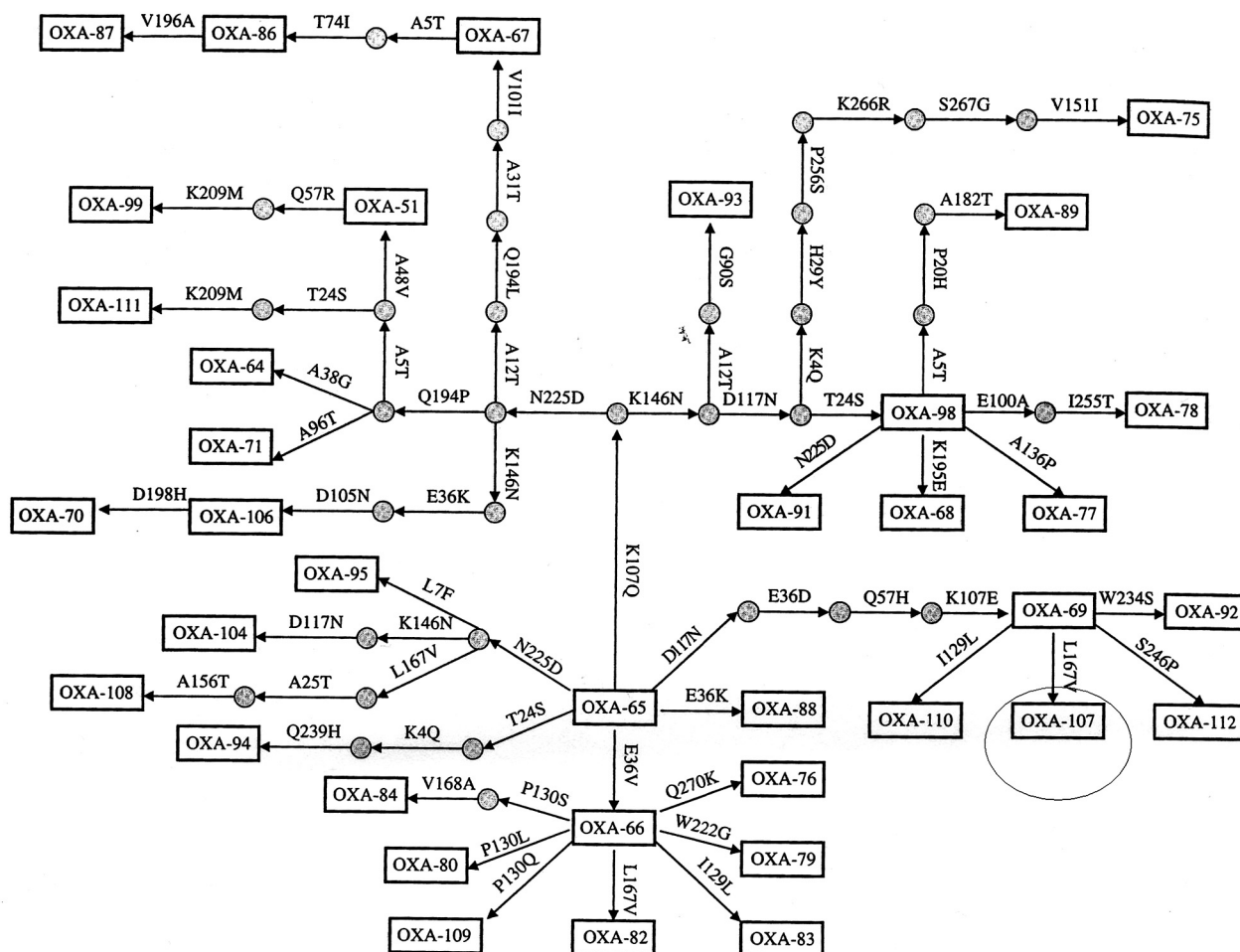
Prisustvo IMP i VIM karbapenemaza povezano je s visokom razinom karbapenemske rezistencije, te podrazumijeva i rezistenciju bakterijskog izolata na sve β -laktame osim aztreonama [13].

Klasa D prema Ambleru

Najveće kliničko značenje danas imaju enzimi koji po molekularnoj Amblerovoj klasifikaciji pripadaju klasi D, a poznati su i pod nazivom oksacilinaze (engl. OXA – *active*

on *oxacillin*). To je velika i brojna skupina β -laktamaza koje obično hidroliziraju oksacilin, meticilin i kloksacilin bolje nego benzilpenicilin, te se njihova aktivnost može inhibirati s NaCl [28]. Porijeklo OXA enzima za sada je dvojbeno; činjenica je da neki geni za OXA enzime imaju kromosomski smještaj, dok su drugi dokazani na plazmidu ili integronu. Svi geni za OXA enzime imaju razmjere C+G 34 do 39%, što je karakteristično za genom *Acinetobacter* u cijelosti [28, 29]. OXA enzimi sa sposobnošću hidrolize karbapenema razvrstani su u osam različitih grana ili grupa, a sličnost sekvencija aminokiselinskog slijeda unutar svake grupe je $\geq 92,5\%$ [30]. Prva grupa OXA enzima predstavljena je kromosomski kodiranom OXA-55 u *Shewanella algae* [31]. U drugu grupu je smještena plazmidom kodirana OXA-48 u *Klebsiella pneumoniae* i kromosomski kodirana OXA-54 u *Shewanella oneidensis* [32, 31]. Treća i četvrta grupa predstavljene su s OXA-50 enzimom u *P. aeruginosa* i OXA-60 enzimom u *Ralstonia pickettii* [33, 34].

Preostale četiri grupe specifične su za kliničke izolate *A. baumannii* i najznačajnije unutar klase D oksacilinaza [30, 35]. U prvu skupinu spada oksacilinaza otkrivena 1985. u Velikoj Britaniji, prvobitno poznata pod nazivom ARI-1 (akronim od *Acinetobacter* rezistentan na imipenem), a kasnije preimenovana u OXA-23 [36], te njoj vrlo sličana (razlikuju se u samo dvije aminokiseline) OXA-27 otkrivena u Singapuru i OXA-49 otkrivena u Kini [37]. Plazmidski kodirana OXA-23 proširila se tijekom 2003. i 2004. godine na većinu bolnica u Velikoj Britaniji, kao i u južnoj Francuskoj, Rumunjskoj, Brazilu, Južnoj Koreji i Polineziji [38, 39]. Novija istraživanja otkrivaju prisustvo OXA-23 oksacilinaze u pet izolata *A. baumannii* iz Ujedinjenih Arapskih Emirata [40]. Najčešće korišteni naziv za ovu skupinu enzima je OXA-23-like skupina. Drugu skupinu oksacilinaza čine OXA-24 i OXA-25 otkrivena u Španjolskoj, OXA-26 otkrivena u Belgiji, i OXA-40 otkrivena u Francuskoj kod bolesnika koji se liječio u Portugalu [41, 37, 42]. Nedavno su toj grupi pridodani



Slika 1. Dendrogramski prikaz OXA enzima koji podrijetlo prikazuje s obzirom na aminokiselinske zamjene u odnosu na enzim OXA-65 (Evans i sur. Clin Microbiol Infect, 2008.) [55]. Unutar kruga nalazi se enzim OXA-107, otkriven u izolatima iz KBC Split
Figure 1. Dendrogram map of OXA enzymes according amino-acid changes from OXA-65 (Evans et al. Clin Microbiol Infect, 2008.) [55]. Inside the circle is OXA-107 enzyme discovered in isolates from Split University Hospital, Split, Croatia

dane OXA 33 i OXA 72 [43]. Neki autori koriste skupni naziv OXA-24-like enzimi, dok novija literatura navodi OXA-40-like kao naziv ove grupe enzima [28]. Prva i druga grupa oksacilinaza dijele 63 % sličnosti u aminokiselinskom slijedu, te 60 % sličnosti s trećom, najvećom i najzastupljenijom grupom oksacilinaza, koje su poznate kao prirodno kromosomski kodirane oksacilinaze [44].

U treću skupinu spadaju OXA-51-like enzimi, najbrojnija i ubikvitarno zastupljena skupina oksacilinaza koja, prema novijim podacima iz 2008. godine, broji 39 enzima [45] među kojima postoje razlike u strukturi od jedne do šesnaest aminokiselina. Po prvi puta su OXA-51 beta-laktamaze otkrivene u izolatima *A. baumannii* u Argentini 2004. godine [46]. Stariji enzimi unutar ove skupine su OXA-64, OXA-65, OXA-66, OXA-68, OXA-69, OXA-70 i OXA-71 [28, 35, 39]. Tijekom 2007. godine ovoj skupini je pridodano 11 novih OXA-51-like enzima pronađenih u kliničkim izolatima *A. baumannii*, označenih kao OXA-79, OXA-80, OXA-82, OXA-104 i OXA106 - OXA112 [47]. Unutar ove skupine nalazi se 2007. godine po prvi put opisana OXA-107 oksacilinaza, prisutna i u izolatima iz KBC Split [47, 48]. Poznato je da OXA-51 skupina enzima ima slabu sposobnost hidrolize karbapenema, ali je i dokazano da može biti povezana sa značajnim smanjenjem osjetljivosti na karbapeneme, kao što je opisano u izolatima iz KBC Split [49]. U ekspresiji karbapenemske rezistencije posredovane enzimom OXA-51 skupine važnu ulogu ima i prisustvo insercijske sekvencije IS*Aba1* (engl. *insertion sequence of A. baumannii*) smještene neposredno uz *bla*_{OXA-51-like} gen [50]. Prisustvo insercijske sekvencije djeluje kao promotor i predstavlja mehanizam rezistencije ili smanjene osjetljivosti na karbapeneme u kliničkim izolatima *A. baumannii*, što je dokazano tijekom šestogodišnje studije na izolatima iz KBC Split [48].

Četvrtu skupinu predstavlja plazmidski kodirana OXA-58, prvi put opisana na karbapenem rezistentnim izolatima *A. baumannii* iz Toulousea, Francuska [51]. OXA-58 dijeli 59 % sličnosti u aminokiselinskom slijedu sa skupinom OXA-51/69 i manje od 50 % s ostalim karbapenem hidrolizirajućim oksacilinazama. Do danas je OXA-58 otkrivena u Španjolskoj, Turskoj, Rumunskoj, Grčkoj, Austriji, Velikoj Britaniji, Argentini, Kuvajtu, Italiji, a izolirana je i u američkih vojnika koji su se borili u Iraku [52]. Ovoj skupini nedavno je priključena i OXA-96, otkrivena u kliničkim izolatima u Singapuru [53], te OXA 97, također plazmidski kodirana oksacilinaza, prvi put opisana u karbapenem rezistentnim izolatima *A. baumannii* podrijetlom iz Tunisa [54]. OXA-97 razlikuje se od OXA-58 supstitucijom jedne aminokiseline u slijedu. Prva i četvrta skupina oksacilinaza (OXA-23 i OXA-58) dijele 48 % sličnosti u aminokiselinskom slijedu [35]. Nova dendrogramska mapa OXA-51-like enzima objavljena početkom 2008. godine otvara novi pogled na evoluciju enzima OXA skupine [55].

Dosadašnje spoznaje o rezistenciji na karbapeneme u izolata *A. baumannii* u Hrvatskoj

Rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj kontinuirano se istražuje posljednjih deset godina pri Akademiji medicinskih znanosti Hrvatske, u čijem sastavu djeluje i Odbor za praćenje rezistencije bakterija na antibiotike [56, 57]. U Hrvatskoj se izolati *A. baumannii* rezistentni na karbapenem počinju javljati 1999. godine, kada je rezistencija na imipenem iznosila između 0 % do 8 % u 22 hrvatska mikrobiološka laboratorija koja su bila uključena u rad Odbora za praćenje rezistencije u Republici Hrvatskoj [56, 58].

Zabrinjavajući porast rezistencije na karbapeneme, poglavito meropenem, zabilježen je posljednjih godina među izolatima *A. baumannii* u velikim bolničkim ustanovama u Hrvatskoj (KBC Split, KBC Zagreb) [57].

Prvi objavljeni podaci o molekularnoj osnovi rezistencije na karbapeneme kliničkih izolata *A. baumannii* u Hrvatskoj su rezultat pilot studije na prikupljenim izolatima iz KBC Split [49]. U radu je prikazano dvanaest izolata koji potječu iz tri različite jedinice intenzivnog liječenja, a molekularnu osnovu predstavlja prisustvo OXA-69-like enzima koji se nalaze u osnovi smanjene osjetljivosti na karbapeneme. Sekvencioniranjem PCR produkta izolata uključenog u pilot studiju otkrivena je OXA-107 oksacilinaza, te važna uloga insercijske sekvencije IS*Aba1* u ekspresiji rezistencije na karbapeneme u kliničkim izolatima *A. baumannii* iz KBC Split [48].

Međunarodni ARPAC (Antibiotic Resistance, Prevention and Control) projekt pokrenut je 2003. godine, a jedan od ciljeva mu je utvrditi postoji li na karbapenem specifično rezistentan klon (klonovi) proširen unutar europskih bolnica. U projekt je uključeno 169 bolnica iz 32 zemlje, a KBC Split je jedina hrvatska bolnica uključena u ovaj međunarodni projekt. Izolati *A. baumannii* rezistentni na karbapeneme iz Kliničkog bolničkog centra Split tipizirani su metodama PFGE i RAPD, a dodatnim analizama sekvencija tri gena unutar klastera (*bla*_{oxa-51-like}, *ompA* i *csuE*) utvrđeno je da pripadaju Europskom klonu I, kojem pripadaju i izolati iz Bugarske, Njemačke, Grčke, Nizozemske, Norveške, Poljske i Slovenije [59]. U Europski klon II pripadaju izolati podrijetlom iz Češke, Njemačke, Grčke, Italije, Španjolske, te izolati iz Poljske, Argentine i Tajvana koji se nalaze i u klonu I i klonu II. Europski klon III izolata *A. baumannii* koji su rezistentni na karbapenem predstavljaju izolati podrijetlom iz Francuske, te ponovo iz Njemačke, Nizozemske i Španjolske [60, 61]. Rezultati engleskih istraživanja objavljeni početkom 2008. godine navode da su tri vrste OXA enzima prisutne u pojedinim klasterima ili klonovima unutar Europe [55, 62]. Najveći broj izolata unutar Europskog klona II sadrži enzim OXA-66 i pripada sekvencijskoj grupi 1 (SG1). Druga po veličini skupina pripada Europskom klonu I i sadrži enzim OXA-69, a pripada sekvencij-

skoj grupi 2 (SG2). Treća skupina prisutna na geografskom području Europe pripada u Europski klon III, sekvencijsku grupu 3 (SG3) i sadrži enzim OXA-71 [55]. Izolati *A. baumannii* iz KBC Split sadrže OXA-107 enzim koji ima osnovu u OXA-69-like enzimu, te se sukladno istraživanju engleske skupine autora uklapaju i po vrsti enzima u Europski klon I [48].

Buduća istraživanja na području rezistencije na karbapeneme kliničkih izolata *A. baumannii* podrazumijevaju izradu multicentrične studije koja bi uključila izolate iz više hrvatskih bolnica. Na osnovu takvog istraživanja dobio bi se i uvid u proširenost Europskog klona I (a moguće i drugih klonova) na geografskom području Hrvatske te istražila osnova rezistencije na karbapeneme u više hrvatskih centara.

Literatura

- [1] Towner KJ. *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. *J Hosp Infect* 2009; 73:355–63.
- [2] Bergogne-Berezin E, Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9:148–65.
- [3] Larson EL. Persistent carriage of gram-negative bacteria on hands. *Am J Infect Control* 1981; 9: 112–9.
- [4] Hanberger H, Garcia Rodriguez JA, Gobernado M, Goossens H, Nilsson LE, Struelens MJ. Antibiotic susceptibility among aerobic gram-negative bacilli in intensive care units in 5 european countries. French and Portuguese ICU Study Groups. *JAMA* 1999; 281: 67–71.
- [5] Jones ME, Draghi DC, Thornsberry C, Karlowski JA, Sahn DF, Wenzel PR. Emerging resistance among bacterial pathogens in the intensive care unit- A European and North American Surveillance study (2000–2002). *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2004; 3:14.
- [6] Paton RH, Miles RS, Hood J, Amyes SGB. ARI-1: β -lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents* 1993; 2: 81–8.
- [7] Vila J, Marti S, Sanchez-Cespedes J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 1210–5.
- [8] Marti S, Sanchez-Cespedes J, Oliveira E, Belido D, Giralt E, Vila J. Proteomic analysis of a fraction enriched in cell envelope proteins of *Acinetobacter baumannii*. *Proteomics* 2006; 6: 82–7.
- [9] Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1980; 289: 321–31.
- [10] Medeiros AA. Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 19–45.
- [11] Jacoby GA. β -Lactamase nomenclature. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:1123–9.
- [12] Gallant CV, Daniels C, Leung JM, et al. Common β -lactamases inhibit bacterial biofilm formation. *Mol Microbiol* 2005; 58: 1012–24.
- [13] Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microb Infect* 2006; 12: 826–36.
- [14] Cornaglia G, Riccio ML, Mazzariol A, Lauretti L, Fontana R, Rossolini GM. Appearance of IMP-1 metallo- β -lactamase in Europe. *Lancet* 1999; 353: 899–900.
- [15] Shibata N, Doi Y, Yamane K, et al. PCR typing of genetic determinants for metallo- β -lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5407–13.
- [16] Lee K, Lee WG, Uh Y, Ha GY, Cho J, Chong Y. VIM and IMP-type metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. in Korean hospitals. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 868–71.
- [17] Tysall L, Stockdale MW, Chadwick PR, et al. IMP-1 carbapenemase detected in an *Acinetobacter* clinical isolate from UK. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49: 217–8.
- [18] Riccio ML, Franceschini N, Boschi L, et al. Characterization of the metallo- β -lactamase 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.
- [19] Takahashi A, Yomoda S, Kobayashi I, Okubo T, Tsunoda M, Iyobe S. Detection of carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in a hospital. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 526–9.
- [20] Chu YW, Afzal-Shah M, Houang ET, et al. IMP-4, a novel metallo- β -lactamase from nosocomial *Acinetobacter* spp. collected in Hong Kong between 1994 and 1998. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 710–4.
- [21] Koh TH, Sng LH, Wang GCY, Hsu LY, Zhao Y. IMP-4 and OXA β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* from Singapore. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 627–32.
- [22] Da Silva GJ, Correia M, Vital C, et al. Molecular characterization of *bla*IMP-5, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from an *Acinetobacter baumannii* nosocomial isolate in Portugal. *FEMS Microbiol Lett* 2002; 215: 33–9.
- [23] Gales AC, Tognim MC, Reis AO, Jones RN, Sader HS. Emergence of an IMP-like metallo-enzyme in *Acinetobacter baumannii* clinical strain from a Brazilian teaching hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 45: 77–9.
- [24] Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 306–25.
- [25] Peleg AY, Franklin C, Walters LJ, Bell JM, Spelman DW. OXA-58 and IMP-4 carbapenem-hydrolyzing β -lactamases in an *Acinetobacter junii* blood culture from Australia. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 399–400.
- [26] Tsakris A, Ikonomidis A, Pournaras S, et al. VIM-1 metallo- β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 981–3.
- [27] Lee K, Yum JH, Yong D, et al. Novel acquired metallo- β -lactamase gene, *bla*(SIM-1), in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 4485–91.
- [28] Heritier C, Poirel L, Fournier PE, Claverie JM, Raoult D, Nordmann P. Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 4174–9.
- [29] Coelho J, Woodford N, Afzal-Shah M, Livermore D. Occurrence of OXA-58-like carbapenemases in *Acinetobacter* spp. collected over 10 years in three continents. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:756–8.
- [30] Walther-Rasmussen J, Hoiby N. Oxa-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 2006; 373–83.

- [31] Heritier C, Poirel L, Nordmann P. Genetic and biochemical characterization of a chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing Ambler class D beta-lactamase from *Shewanella* algae. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1670–5.
- [32] Poirel L, Heritier C, Tolun V. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 15–22.
- [33] Girlich D, Naas T, Nordmann P. Biochemical characterization of the naturally occurring oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 2034–8.
- [34] Girlich D, Naas T, Nordmann P. OXA-60, a chromosomal, inducible, and imipenem hydrolyzing class D beta-lactamase from *Ralstonia pickettii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 4217–25.
- [35] Brown S, Amyes S. OXA beta-lactamases in *Acinetobacter*: the story so far. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 1–3.
- [36] Donald HM, Scaife W, Amyes SG, Young HK. Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA beta-lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 196–9.
- [37] Afzal-Shah M, Woodford N, Livermore DM. Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D beta-lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 583–8.
- [38] Coelho JM, Turton JF, Kaufmann ME, et al. Occurrence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clones at multiple hospitals in London and Southeast England. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3623–7.
- [39] Brown S, Amyes SGB. The sequences of seven class D beta-lactamases isolated from carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from four continents. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 326–8.
- [40] Mugnier P, Poirel L, Pitout M, Nordmann P. Carbapenem-resistant and OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* isolates in the United Arab Emirates. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 879–82.
- [41] 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 Chemother* 2000; 44: 1556–61.
- [42] Heritier C, Poirel L, Aubert D, Nordmann P. Genetic and functional analysis of the chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-40 of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 268–73.
- [43] Lu PL, Doumith M, Livermore DM, Chen TP, Woodford N. Diversity of carbapenem resistance mechanisms in *Acinetobacter baumannii* from a Taiwan hospital: spread of plasmid-borne OXA-72 carbapenemase. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63: 641–7.
- [44] Merkl AK, Centron D. *Bla*OXA-51 type beta-lactamase genes are ubiquitous and vary within a strain in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 28: 110–3.
- [45] beta-Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes <http://www.lahey.org/studies/webt.asp>
- [46] Brown S, Young HK, Amyes SGB. Characterisation of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 15–23.
- [47] Evans BA, Brown S, Hamouda A, Findlay J, Amyes SGB. Eleven novel OXA-51-like enzymes from clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 1137–8.
- [48] Goić-Barišić I, Bedenić B, Tonkić M, et al. Occurrence of OXA-107 and IS*Aba1* in carbapenem-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* from Croatia. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 3348–9.
- [49] Goić-Barišić I, Bedenić B, Tonkić M, Katić S, Kalenić S, Punda-Polić V. First report of molecular characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in different intensive care units in University Hospital Split, Croatia. *J Chemother* 2007; 19: 416–8.
- [50] Turton JF, Ward ME, Woodford N, et al. The role of IS*Aba1* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol Lett* 2006; 258: 72–7.
- [51] Poirel L, Marque S, Heritier C, Seqonds C, Chabanon G, Nordmann P. OXA-58, a novel class D beta-lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 202–8.
- [52] Jones A, Morgan D, Walsh A, et al. Importation of multidrug-resistant *Acinetobacter* spp infections with casualties from Iraq. *Lancet Infect Dis* 2006; 6: 317–8.
- [53] Koh TH, Sng LH, Wang GCY, Hsu LY, Zhao Y. IMP-4 and OXA beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii* from Singapore. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 627–32.
- [54] Poirel L, Mansour W, Bouallegue O, Nordmann P. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Tunisia producing the OXA-58-like carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-97. *Antimicrobial Agents Chemother* 2008; 52: 1613–7.
- [55] Evans BA, Hamouda A, Towner KJ, Amyes SGB. OXA-51-like beta-lactamases and their association with particular epidemic lineages of *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 268–75.
- [56] Tambić Andrašević A, Tambić T, Kalenić S, Janković V. Surveillance for antimicrobial resistance in Croatia. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 14–8.
- [57] Odbor za praćenje rezistencije bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj. Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2007. godini. AMZH, Zagreb 2008.
- [58] Van Looveren M, Goossens H. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp. in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 684–704.
- [59] Towner KJ, Levi K, Vlassiadi M. Genetic diversity of carbapenem-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 161–7.
- [60] Towner KJ. Global epidemiology of *Acinetobacter*. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13 (Suppl 1): S47 S242.
- [61] Van Dessel H, Dijkshoorn L, van der Reijden T, et al. Identification of a new geographically widespread multiresistant *Acinetobacter baumannii* clone from European hospitals. *Res Microbiol* 2004; 155: 105–12.
- [62] Evans B, Hamouda A, Towner K, Amyes S. The OXA-51-like enzymes of *Acinetobacter baumannii*: markers of success? *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 7; S60 O296.