

## MOVILIZACION DE GENES QUE CODIFICAN RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS DESDE *ACINETOBACTER CALCOACETICUS*

### Antibiotic resistant coding genes mobilization from *Acinetobacter calcoaceticus*

HENRIETTE CHABOUTY G.\*, RAÚL ZEMELMAN Z.\* Y ROLANDO MONTOYA M.\*\*

#### RESUMEN

Se investigó la codificación genética de la resistencia de 12 cepas de *Acinetobacter calcoaceticus* aisladas de productos patológicos obtenidos en el Hospital Clínico Regional "Guillermo Grant B." de Concepción, Chile. Se determinaron los patrones y niveles de resistencia a los antibióticos de mayor uso clínico. Se encontraron patrones de resistencia amplios que incluyeron ampicilina, cloranfenicol, sulfametoxazol, cotrimoxazol, kanamicina y gentamicina. Sin embargo, no se detectaron plásmidos R en estas cepas. Con el objeto de movilizar probables transposones ubicados en el genoma cromosomal, se efectuaron experimentos de transformación y conjugación, usando el plásmido RP4. En algunos casos se recuperó el plásmido RP4 con peso molecular aumentado. Por otro lado, después de curación se observó una disminución del peso molecular de este plásmido y la pérdida de resistencia a algunos antibióticos. Estos y otros resultados nos llevan a concluir que en cepas de *A. calcoaceticus* la resistencia se encuentra codificada por transposones movilizables ubicados en el cromosoma bacteriano.

#### ABSTRACT

The genetic coding of antibiotic resistance was investigated in 12 strains of *Acinetobacter calcoaceticus* isolated from clinical specimens at the Hospital Clínico Regional "Guillermo Grant B.", Concepción, Chile. Antibiotic resistance patterns and levels were determined against the most clinically used antibiotics. It was found that these strains have broad-spectrum resistance patterns which include ampicillin, chloramphenicol, sulfametoxazole, cotrimoxazole, and gentamicin, yet no plasmids were detected among them. Conjugation and transformation experiments were performed in order to mobilize possible transposons located in the chromosomal genome, using RP4 plasmid which was introduced into *A. calcoaceticus* and later transferred into one recipient strain of *Escherichia coli*. Curing experiments were also performed with strains possessing RP4. In some cases RP4 plasmid was recovered but showing an increase of its molecular weight. On the contrary, after curing, molecular weight decreased and resistance to gentamicin and tetracycline was lost. These and some other similar results led us to conclude that resistance to some of the antibiotics in the strains of *A. calcoaceticus* under study, was coded by mobilizable transposons.

KEYWORDS: *Acinetobacter calcoaceticus*. Antibiotic resistant genes. Transposons. Transformation. Conjugation. Plasmid curing. Genes mobilization.

\*Depto. de Microbiología. \*\*Depto. de Biología Molecular Facultad de Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales. Casilla 2407, Ap. 10, Universidad de Concepción.

## INTRODUCCION

Durante los últimos años el espectro de especies bacterianas implicadas en infecciones humanas ha aumentado considerablemente. Las causas de este problema son numerosas, entre ellas destaca el uso indiscriminado de agentes antibacterianos, el mejoramiento en las técnicas de cultivo y de los métodos de clasificación bacteriana.

Actualmente se aíslan microorganismos a los que hasta hace algún tiempo no se atribuía importancia clínica, pues eran considerados como bacterias saprófitas ambientales. Por otro lado, el principal problema en el tratamiento de las infecciones intrahospitalarias causadas por estas bacterias, es la multiresistencia a los antibióticos. A ello, se añaden problemas en los enfermos que, generalmente, presentan sus defensas inmunológicas disminuidas. *Acinetobacter calcoaceticus* se encuentra dentro de estas bacterias saprófitas, que se comportan como patógenos oportunistas y frecuentemente se aíslan como agente etiológico de infecciones importantes (Buxton et al., 1978; Sherertz y Sullivan, 1985). Se trata de un bacilo Gram negativo, aerobio estricto, no fermentador, con una amplia distribución en la naturaleza (Lautrop, 1984).

Un 25% de los individuos sanos, son portadores de *A. calcoaceticus* en la piel y con menor frecuencia en el aparato respiratorio (Rubin et al., 1980). Se les ha aislado de soluciones desinfectantes, de equipos y de manos de personal hospitalario (Retailliau et al., 1979). Las cepas aisladas en Chile (Cañas et al., 1985) como en el extranjero (García et al., 1983) poseen una variada resistencia a antibióticos de uso común en la terapia médica. Sin embargo, a la fecha, poco se conoce acerca de los fundamentos genéticos de la resistencia, los informes acerca del origen cromosomal o extracromosomal de estos genes, son discrepantes. Existen evidencias de producción de beta lactamasas codificadas cromosomalmente por estas bacterias (Bello, 1986). Por otro lado, con frecuencia aparecen bacterias resistentes a antibióticos aminoglicósidos, cuyas enzimas inactivantes están codificadas en plasmidios presentes en *A. calcoaceticus* (Murray y

Moellering, 1980).

Ahora sabemos que es la presencia de transposones lo que explica el establecimiento cromosomal o plasmidial de los genes de resistencia (Cornelis, 1982; Levy, 1987). Concordante con este postulado, Devaud et al. (1982) no detectaron plasmidios en cepas de *A. calcoaceticus* resistentes aisladas en Suiza, pero fueron capaces de movilizar un transposon de 16 Megadaltones en masa. Por otro lado, Divers et al. (1985) aislaron en Inglaterra, un plasmidio que llamaron pAV5 que se disocia en dos plasmidios menores merced a un transposon que determina la resistencia a kanamicina.

Con el objeto de estudiar la situación a *A. calcoaceticus* aislados de diversas infecciones, se determinaron los patrones de resistencia/susceptibilidad a antibióticos de uso común en la terapia médica y se investigó la presencia de ADN extracromosomal (plasmidios y/o transposones) que expliquen las características fenotípicas de resistencia.

## MATERIALES Y METODOS

### Cepas bacterianas:

Doce cepas de *Acinetobacter calcoaceticus* biotipo *anitratu*s se aislaron de diferentes productos patológicos (secreción nasal, secreción ótica, pus y orina). *E. coli* K12L + se utilizó como cepa receptora en los experimentos de transformación bacteriana y *E. coli* RP4 (Datta et al., 1971; Towner y Vivian, 1976) como cepa dadora del plasmidio RP4 en experimentos de conjugación.

### Ensayo de susceptibilidad:

Se realizaron por el método de difusión en agar de Ericsson y Sherris (1971). Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) se determinaron por el método de Steers et al. (1959) aplicando un inóculo de  $10^5$  unidades formadoras de colonias.

### Extracción de plasmidios:

Se usó el método de extracción alcalina de Olsen (1990) que combina las metodologías des-

critas por Birnboim y Doly (1979) y Kado y Liu (1981).

### Electroforesis en geles de agarosa:

La separación y visualización de los plasmidios se realizó en geles de agarosa de concentraciones 0,9 a 1,5% (p/v) según recomendaciones de Montoya (1988).

### Curación de plasmidios:

En la eliminación de plasmidios se utilizó bromuro de etidio, sodio dodecil sulfato y naranja de acridina (Elwell et al., 1977; Elwell y Falkow, 1980; Tomoeda et al., 1968).

### Transformación bacteriana:

Se utilizó la técnica descrita por Maniatis et al. (1982) en la cual, las células competentes son permeabilizadas con cloruro de calcio, previo a la transformación con el ADN plasmidial.

### Conjugación bacteriana:

Se usó la técnica cualitativa de conjugación bacteriana en filtro, descrita por Towner y Vivian (1976); los transconjugantes fueron seleccionados en placas con niveles de antibiótico inferior a la concentración mínima inhibitoria.

### Identificación de enzimas inactivantes de antibióticos:

Se usó el método descrito por Van de Klunder et al. (1984) para la fosforilación que inactiva a kanamicina y de acetilación que inactiva a gentamicina. La identificación de cloranfenicol acetil transferasa (CAT) se realizó por el método no enzimático de Burns et al. (1985).

## RESULTADOS

Las doce cepas de *A. calcoaceticus* presentaron un comportamiento muy parecido frente a los antibióticos estudiados (Tabla I). Todas fueron susceptibles a tetraciclina, ácido nalidixico y rifampicina (CMI = 2 - 16 µg/ml). Frente a

estreptomycin presentaron una resistencia mediana (CMI = 32 - 64 µg/ml). Los niveles de resistencia fueron elevados para cloranfenicol, gentamicina, sulfametoxazol, cotrimoxazol y ampicilina (CMI ≥ 256 µg/ml). Frente a kanamicina las cepas se dividieron en dos grupos, uno marcadamente resistente con CMI ≥ 1024 µg/ml y otro muy susceptible con CMI = 2 µg/ml.

TABLA I. Niveles de susceptibilidad o resistencia de las cepas de *A. calcoaceticus* a diferentes antibióticos.

CEPA	CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA (µG/ml)									
	A	AN	C	E	G	K	R	S	ST	T
3	1024	16	256	8	32	2	4	256	256	2
64	512	16	256	64	512	2	16	256	256	2
66	256	16	256	64	256	2	16	256	256	2
67	256	16	256	8	256	2	8	256	256	2
71	512	16	256	64	512	2	16	256	256	2
4	1024	16	256	32	256	≥1024	8	256	256	2
32	1024	16	256	32	128	≥1024	4	256	256	2
37	1024	16	256	64	512	≥1024	8	256	256	2
43	1024	16	256	32	512	≥1024	8	256	256	2
52	1024	16	256	32	512	≥1024	8	256	256	2
60	1024	16	256	32	256	≥1024	8	256	256	2
73	1024	16	256	32	512	≥1024	8	256	256	2

Ampicilina (A), ácido nalidixico (AN), cloranfenicol (C), estreptomycin (E), gentamicina (G), kanamicina (K), rifampicina (R), sulfametoxazol (S), cotrimoxazol (ST), tetraciclina (T).

Un estudio del contenido plasmidial en las doce cepas de *A. calcoaceticus* demostró la presencia de un plasmidio de peso molecular aproximado a 2 Md en dos de ellas (cepas 3 y 67). La ausencia de plasmidios R se confirmó además porque las cepas al ser cultivadas con agentes curantes (bromuro de etidio, SDS, naranja de acridina) no pierden sus determinantes de resistencia.

Estos resultados indican que los genes de resistencia podrían formar parte de transposones localizados en el cromosoma bacteriano y su movilización se podría realizar si ellos forman parte de transposones cromosomales activos. Para lograr este objetivo se intentó transformar cepas competentes de *A. calcoaceticus* con un plasmidio al cual pudiera saltar el transposon. El plasmidio usado fue pBR322 (A.T)<sup>R</sup>. Repetidas transformaciones fueron negativas aun cuando variaron las condiciones experimentales por Maniatis et al. (1982).

Mediante conjugación bacteriana se logró introducir el plasmidio RP4 (A.K.T.)<sup>R</sup> en *A. calcoaceticus*. Con la cepa *A. calcoaceticus* 64 (K,T)<sup>S</sup> (A,C,G)<sup>R</sup> como receptora se obtuvieron transconjugantes *A. calcoaceticus* que se denominaron T1 (A,C,G,K,T)<sup>R</sup> con una frecuencia de  $7 \times 10^{-5}$ . Esta cepa, a su vez, se usó como dadora frente a la cepa receptora *E. coli* K12 (AN)<sup>R</sup>, L+. Los transconjugantes que se obtuvieron fueron de dos tipos: *E. coli* denominados T2, L+ (AN,A,K,T)<sup>R</sup> con una frecuencia de  $1,6 \times 10^{-6}$  y T'2, L+ (AN,A,C,G,K,T)<sup>R</sup> con una frecuencia de  $1,5 \times 10^{-7}$  (Tabla II).

El análisis plasmidial de las cepas demostró que *A. calcoaceticus* T1 y *E. coli* T2 poseen el plasmidio RP4 de 38 Megadaltones. La cepa transconjugante *E. coli* T'2 presentó una banda plasmidial de 45 Megadaltones (Tabla II). Las cepas transconjugantes *A. calcoaceticus* T1, *E. coli* T2 y *E. coli* T'2 fueron cultivadas en presencia de bromuro de etidio (30 µg/ml). La cepa *A. calcoaceticus* T1 perdió los marcadores de resistencia a kanamicina y tetraciclina con una frecuencia de 70%. La cepa transconjugante *E. coli* T2 no presentó curación de los genes de resistencia. La cepa T'2 presentó curación de los genes de resistencia a tetraciclina y gentamicina con una frecuencia de 2%.

El plasmidio de la cepa curada *E. coli* T'2c tiene un peso molecular de 36 Megadaltones. La cepa curada *A. calcoaceticus* T1c no presentó plasmidios.

Los plasmidios de *E. coli* T'2 y de *E. coli* T'2c usados en experimentos de transformación de células competentes *E. coli* K12 demostraron la separación de los determinantes de resistencia a cloranfenicol y gentamicina. Con el plasmidio de *E. coli* T'2 se obtuvieron dos clases de transformantes, denominados *E. coli* F'2a con idéntico patrón de resistencia al del plasmidio transformante y *E. coli* F'2b susceptible a cloranfenicol. Con el plasmidio de la cepa curada *E. coli* T'2c se obtuvieron transformantes *E. coli* F'2c que tiene los genes de resistencia del plasmidio original.

El análisis plasmidial de los transformantes demostró que *E. coli* F'2a y *E. coli* T'2 poseen idéntico plasmidio. La cepa *E. coli* F'2b que

perdió el gen de resistencia a cloranfenicol presentó un plasmidio de 39 Megadaltones (Tabla II).

Con el objeto de corroborar la movilización de los genes de resistencia a gentamicina y cloranfenicol desde *A. calcoaceticus* se investigó la presencia de las enzimas involucradas en la inactivación de estos antibióticos. La enzima acetilante de gentamicina (AA(3)II) y la enzima cloranfenicol acetil transferasa (CAT) son producidas por todas las cepas resistentes a gentamicina y cloranfenicol, respectivamente (Tabla II).

TABLA II. Patrones de resistencia, plasmidios y enzimas inactivantes de antibióticos beta lactámicos, aminoglicósidos y cloranfenicol en cepas de *A. calcoaceticus*, *E. coli* y derivadas.

CEPAS BACTERIANAS	ANTIBIÓTICOS				PLASMIDIOS (MD)	ENZIMAS INACTIVANTES
	A	C	G	K T		
<i>E. coli</i>	R	S	S	R R	RP4(38)	APH 3'
<i>A. calcoaceticus</i> 64	R	R	R	S S	-	AAC (3) II; CAT
<i>A. calcoaceticus</i> T1	R	R	R	R R	RP4(38)	APH 3'; AAC (3) II; CAT
<i>A. calcoaceticus</i> T1c	R	R	R	S S	-	AAC (3) II; CAT
<i>E. coli</i> T2	R	S	S	R R	RP4(38)	APH3'
<i>E. coli</i> T'2	R	R	R	R R	pT'2 (45)	APH 3'; AAC (3) II; CAT
<i>E. coli</i> F'2a	R	R	R	R R	pT'2 (45)	APH 3'; AAC (3) II; CAT
<i>E. coli</i> F'2b	R	S	R	R R	pF'2c (39)	APH 3'; AAC (3) II
<i>E. coli</i> T'2c	R	R	S	S S	pT'2c (36)	APH 3'; CAT
<i>E. coli</i> F'2c	R	R	S	S S	pT'2c (36)	APH 3'; CAT

Ampicilina (A), cloranfenicol (C), gentamicina (G), kanamicina (K), tetraciclina (T); cepas resistentes (R), cepas susceptibles (S); enzima fosforilante de kanamicina (APH 3'), enzima acetilante de gentamicina (AAC(3) II), cloranfenicol acetil transferasa (CAT).

## DISCUSION

Las cepas de *A. calcoaceticus* presentaron una resistencia variada a antibióticos comúnmente utilizados en la terapia médica. La resistencia a aminoglicósidos de las cepas concuerda con otros informes de autores que postulan que *A. calcoaceticus* resistentes a uno o más aminoglicósidos son los bacilos Gram negativos de mayor frecuencia de aislamiento clínico (Murray y Moellering, 1979). La resistencia a cloranfenicol también ha sido informada para este bacilo (Retailiau et al., 1979), observándose un mayor porcentaje de cepas resistentes cuando son aislados de aguas contaminadas por coliformes (Kelch y Lee, 1978).

El análisis plasmidial y los experimentos de

curación de las cepas originales confirman la ausencia de plasmidios R, por lo tanto los genes de resistencia deben ubicarse en transposones del cromosoma bacteriano, resultados que coinciden con lo informado por Devaud et al. (1982).

Los genes de resistencia a cloranfenicol y gentamicina se movilizaron desde el cromosoma bacteriano de *A. calcoaceticus* al plasmidio RP4. En estudios de conjugación con cepas de *A. calcoaceticus* efectuados por Towner y Vivian (1976) y Chopade et al. (1985) se informaron frecuencias de conjugación semejantes a las obtenidas con los transconjugantes *A. calcoaceticus* T1 y *E. coli* T2. Los determinantes de resistencia a cloranfenicol y gentamicina se sitúan en un fragmento de ADN de 7,0 Megadaltones, la presencia de estos genes se confirmó detectando las enzimas involucradas en la inactivación de los antibióticos respectivos. Se descartó la formación de un cointegrado entre un plasmidio de *A. calcoaceticus* y el plasmidio RP4, debido a la ausencia de plasmidios R en las cepas originales.

Murray y Moellering (1979, 1980) informaron la presencia de enzimas modificantes de aminoglicósidos en *A. calcoaceticus*; la codificación de resistencia a gentamicina y cloranfenicol en el transposón movilizado se confirma en los experimentos de transformación con el plasmidio recombinante, los transformantes adquieren las características fenotípicas codificadas en el plasmidio recombinante.

La pérdida de resistencia a cloranfenicol y/o gentamicina se asocia con la pérdida del gen de tetraciclina, lo que sugiere una cercanía en la ubicación de ambos genes en el plasmidio recombinante.

Los experimentos de transformación y de curación permiten plantear una probable separación física de los transposones de resistencia a gentamicina y cloranfenicol, es decir, se postula la existencia de dos transposones activos e independientes.

Los experimentos de curación de los transconjugantes *A. calcoaceticus* T1 y *E. coli* T2 muestran una inestabilidad de los plasmidios R en *A. calcoaceticus*, resultados que explicarían la ausencia de plasmidios en las cepas originales investigadas.

Los resultados obtenidos permiten postular el probable origen de la resistencia a antibióticos en las cepas de *A. calcoaceticus* estudiadas. Tales cepas habrían recibido, por conjugación u otro mecanismo de traspaso de información genética, plasmidios R que no lograron establecerse en el huésped; sin embargo, los genes que codifican la resistencia estarían ubicados en transposones capaces de mantenerse en forma estable por inserción en el ADN cromosomal de las cepas de *A. calcoaceticus*.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado a través del Proyecto FONDECYT N° 90-0182.

## BIBLIOGRAFIA

- Bello, H. 1986. Resistencia de cepas de *Acinetobacter calcoaceticus* de origen hospitalario a antibióticos beta lactámicos. Tesis para optar al Grado de Magister en Ciencias con mención en Microbiología de la Universidad de Concepción. 145 páginas.
- Birnboim, H. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids. Res.*, 7:1513-1523.
- Burns, J., Mendelman, P., Levy, J., Stull, T. and A. Smith. 1985. A permeability barrier as a mechanism of chloramphenicol resistance in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 27: 46-54.
- Buxton, A., Anderson, R., Werdegar, D. and E. Atlas. 1978. Nosocomial respiratory tract infection and colonization with *Acinetobacter calcoaceticus* J. *Med.*, 65: 507-513.
- Cañas, P., Joyas, A. and V. Campos. 1985. *Acinetobacter calcoaceticus* var *anitratu*s como patógeno oportunista. Tolerancia a desinfectantes y multiresistencia a antibióticos. Resumen del IX Congreso Chileno de Microbiología. Santiago. Pág. 43.
- Chopade, B., Wise, P. and K. Towner. 1985. Plasmid transfer and behaviour in *Acinetobacter calcoaceticus* EBF 65/65. *J. Gen Microbiol.*, 131: 2805-2811.
- Cornelis, G. 1982. Les transposons et sequences d'insertion. *Bull. de l'Institut Pasteur*, 80: 3-59.
- Datta, N., Hedges, R., Shaw, E., Sykes, R. and M. Richmond. 1971. Properties of an R factor from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 108: 1244-1249.
- Devaud, M., Kayser, F. and B. Bachi. 1982. Transposon-

- mediated multiple antibiotic resistance in *Acinetobacter* strains. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 22:323-329.
- Divers, M., Craven, L. and A. Vivian. 1985. Molecular analysis and antibiotic resistance plasmid, pAV 5 and its derivative plasmids in *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Gen. Microbiol.*, 131: 3367-3374.
- Elwell, L., Saunders, J., Richmond, M. and S. Falkow. 1977. Relationships among some R plasmids found in *Haemophilus influenzae*. *J. Bacteriol.*, 131:356-362.
- Elwell, L. and S. Falkow. 1980. The characterization of plasmids that carry antibiotic resistance genes. Págs. 433-453. In: *Antibiotics in Laboratory Medicine*. V. Lorian (Ed.). Editorial Williams and Wilkins Co. Baltimore/London. 736 páginas.
- Erickson, H.M. and J.C. Sherris. 1971. Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study. *Acta Path. Microbiol. Scand. Suppl.*, 217: 1-90.
- García, I., Fainstein, V., Le Blanc, B. and G. Bodey. 1983. *In vitro* activities of new beta lactam antibiotics against *Acinetobacter* spp. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 24: 297-299.
- Kado, C. and S. Liu 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.*, 145: 1365-1373.
- Kelch, W. and J. Lee. 1978. Antibiotic resistance patterns of Gram negative bacteria isolated from environmental sources. *Appl. Environm. Microbiol.*, 36: 450-456.
- Lautrop, H. 1984. Genus IV. *Acinetobacter*. Págs. 436-438. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. N.R. Krieg and J.H. Holt (Ed.). Editorial Williams and Wilkins Co. Baltimore/London. 964 páginas.
- Levy, S.B. 1987. Environmental dissemination of microbes and their plasmids. *Swiss Biotech.*, 5(2a): 32-37.
- Maniatis, T., Fritsch, E. and J. Sambrook. 1982. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Págs. 249-255. Editorial Cold Spring Harbor Laboratory. 545 páginas.
- Montoya, R. 1988. Análisis del ADN extracromosomal (plasmidios) en *Aeromonas hydrophila* de la Octava Región, Chile. Tesis para optar al Grado de Magister en Ciencias con mención en Bioquímica de la Universidad de Concepción. 77 páginas.
- Murray, B. and Moelling. 1979. Aminoglycoside-modifying enzymes among clinical isolates of *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. *anitratus* (*Herellea vaginicola*): explanation for high-level aminoglycoside resistance. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 15:190-199.
- Murray, B. and R. Moelling. 1980. Evidence of plasmid mediated production of aminoglycoside-modifying enzymes not previously described in *Acinetobacter*. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 17: 30-36.
- Olsen, J.E 1990. An improved method for rapid isolation of plasmid DNA from wildtype Gram-negative bacteria for plasmid restriction profile analysis. *Lett. Appl. Microbiol.*, 10: 209-212.
- Retailliau, H. Hightower, A., Dixon, R. and E. Allen. 1979. *Acinetobacter calcoaceticus* a nosocomial pathogen with an unusual seasonal pattern. *J. Infect. Dis.*, 139: 371-375.
- Rubin, J., Granato, P. and L. Wasilanskas. 1980. Glucose-nonfermenting Gram-negative bacteria. Págs. 263-287. In: *Manual of Clinical Microbiology*. Third Edition. E. Lennette, A. Ballows, W. Hansler and J. Truant (Ed.) Editorial American Society for Microbiology. Washington, D.C. (USA). 970 páginas.
- Sherertz, R. and M. Sullivan. 1985. An outbreak of infections with *Acinetobacter calcoaceticus* in burnt patient: contamination of patient's mattresses. *J. Infect. Dis.*, 151: 252-258.
- Steers, E., Foltz, E. and B. Graves. 1959. An inocula replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. *Antibiot. Chemother.*, 9:307-311.
- Tomoeda, M., Inusuka, M., Kubo, N. and S. Nakamura. 1968. Effective elimination of drug resistance and sex factors in *Escherichia coli* by sodium dodecyl sulfate. *J. Bacteriol.*, 95: 1078-1089.
- Towner, K. and A. Vivian. 1976. RP4-mediated conjugation in *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Gen. Microbiol.*, 93: 355-360.
- Van de Klundert, J., Vliгентhart, J., Van Doorn, E., Bongaerts, G., Molendijk, L. and R. Mouton. 1984. A simple method for the identification of aminoglycoside-modifying enzymes. *J. Antimicrob. Chemother.*, 14: 339-348.