

Caracterização genotípica de uma estirpe endémica de Acinetobacter Baumannii:

Disseminação intra e inter-hospitalar

G. da Silva[1], M. Correia[2], T. Semedo[3], J. Quaresma[4], L. M. Lito[4], J. Melo Cristino[4], M. J. Salgado[4], O. Araújo[5], O. Chantre[5], J. Marques[5], M. A. Pessanha[6], F. Martins[6], L. Peixe[7], R. Tenreiro[3], A. Duarte[2]*

1 Laboratório de Microbiologia, Faculdade de Farmácia, Coimbra; 2 Laboratório de Microbiologia, Faculdade de Farmácia, Lisboa; 3 Departamento de Biologia Vegetal, Faculdade de Ciências, Lisboa; 4 Laboratório de Microbiologia, Faculdade de Medicina, Hospital Santa Maria, Lisboa; 5 Laboratório de Microbiologia, Hospital São José, Lisboa; 6 aboratório de Microbiologia, Hospital São Francisco Xavier, Lisboa; 7 Laboratório de Microbiologia, Faculdade de Farmácia, Porto.

RESUMO

Durante três anos, 236 isolados de Acinetobacter baumannii foram recolhidos de pacientes e amostras ambientais de seis hospitais portugueses. Todos os isolados apresentavam o mesmo perfil de multiresistência (b-lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas), apresentando susceptibilidade à polimixna B. O principal objectivo deste estudo foi avaliar a relação clonal entre estes isolados. Utilizaram-se três métodos moleculares de tipificação: PFGE, M13-PCR e MSP-PCR. Por PFGE observou-se um perfil predominante, designado perfil A, que se subdividiu em A1, A2, e A3 de acordo com a variação de uma banda. O perfil A foi depois subdividido pelos resultados do M13-PCR em três perfis a, b e c. O método MSP-PCR não mostrou capacidade suficientemente discriminatória relativamente aos outros dois métodos, uma vez que apenas se observou um perfil, designado I, entre os isolados. Este estudo mostrou que a técnica M13-PCR pode ser usada em estudos epidemiológicos com resultados satisfatórios, obtidos mais rapidamente, em relação ao PFGE. De acordo com os resultados obtidos com os três métodos de tipificação, PFGE, M13-PCR e MSP-PCR, verificou-se existência do mesmo "clone" disperso entre os seis hospitais. Os resultados sugerem a transmissão intra e inter-hospitalar de uma estirpe endémica de A. baumannii e realçam a necessidade de implementar medidas eficazes de controlo da infecção nosocomial.

ABSTRACT

During a period of three years, 236 isolates of Acinetobacter baumannii obtained from patients and environmental samples were recovered in six Portuguese hospitals. All strains exhibited a similar multiresistance pattern, namely to b-lactam, aminoglycosides and quinolones. Only polymyxin B displayed consistent activity. The aim of this study was to determine the clonal relatedness of these A. baumannii isolates. Three molecular typing methods were used: PFGE, M13 PCR and MSP-PCR. Using PFGE, one pattern A was observed. Intraprofile subdivision A1, A2, A3 was made in according single-band variations of the core pattern A. The pattern A were also further subdivided by M13-PCR into three group a, b, c. MSP-PCR didn't show enough discriminatory power because only one pattern I was identified among A. baumannii isolates. Taking into account the PFGE profile A1, the M13-PCR fingerprint a1, and MSP-PCR pattern I a clonal origin was verified among A. baumannii isolates. This study has demonstrated that M13-PCR could be used in routine, due to the results obtained compared to those of PFGE. The results suggest the intra and interhospital transmission of a multiresistant endemic strain of A. baumannii and emphasize the challenge of controlling the spread of these organisms.

INTRODUÇÃO

Os microrganismos do género Acinetobacter encontram-se amplamente distribuídos na natureza, fazendo parte da flora comensal da pele de alguns indivíduos [1,2]. Algumas estirpes são especialmente resistentes a condições de dessecação, conseguindo sobreviver durante dias no meio ambiente, o que pode contribuir para o aparecimento e persistência de surtos infecciosos nosocomiais [1].

Nos últimos anos, vários estudos têm revelado um aumento da infecção nosocomial devida a Acinetobacter baumannii, especialmente em Unidades de Cuidados Intensivos (UCIs) e Unidades de Queimados (UQs) [1,3,4]. Muitos pacientes estão apenas colonizados, mas o debilitado estado imunológico de muitos deles, propicia o desenvolvimento de infecções. A transmissão entre doentes é facilitada pela capacidade de Acinetobacter spp.



permanecer nas mãos do pessoal clínico e no ambiente inanimado 3.

Durante a ocorrência de surtos infecciosos é importante determinar a relação clonal entre os isolados bacterianos de forma a tomar medidas de controlo da disseminação da infecção. Vários métodos têm sido usados para realizar a tipificação de isolados de Acinetobacter spp. Os métodos moleculares, como a análise dos perfis de macro-restrição de DNA cromossomal seguida de electroforese em gel de agarose em campo pulsado (PFGE) e as impressões digitais de DNA geradas pela reacção de amplificação em cadeia (PCR), são os que melhores resultados apresentam 1,4-9.

No final de 1998, um aumento do número de infecções nosocomiais devido a A. baumannii ocorreram em seis hospitais portugueses, quer como casos isolados, quer como surtos. Todos os isolados apresentavam resistência a vários agentes antimicrobianos, como penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos, quinolonas e aminoglicosídeos. Assim, o principal objectivo deste estudo foi determinar a relação clonal entre os isolados de A. baumannii multiresistentes recolhidos destes hospitais com diferente localização geográfica e avaliar a disseminação intra e inter-hospitalar destes isolados, utilizando como métodos de tipificação a análise por PFGE e dois métodos de PCR, um com o "primer" M13 (M13-PCR) e o outro com "primers" micro-satélites (MSP-PCR). Este último método nunca foi utilizado na tipificação de Acinetobacter spp., tendo sido incluído com o intuito de conhecer a sua capacidade discriminatória entre estirpes face aos outros métodos já descritos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Estirpes bacterianas

Duzentos e trinta e seis isolados de A. baumannii foram recolhidos de seis hospitais localizados em Lisboa, Coimbra, Caldas da Rainha e Setúbal. No Hospital de Santa Maria (HSM), em Lisboa, foram recolhidos 108 isolados entre Outubro de 1998 e Setembro de 2000. Durante o período compreendido entre Fevereiro 1999 e Março de 2001 foram recolhidos 70 isolados do Hospital São Francisco Xavier (HSFX), enquanto do Hospital São José (HSJ) de Lisboa foram recolhidos 43 isolados durante o mês de Agosto de 2000. Sete isolados dos Hospitais da Universidade de Coimbra (HUC), foram recolhidos da Unidade de Queimados, durante um surto, entre Janeiro e Março de 2000. Dos restantes 8 isolados, 5 foram identificados de doentes internados na UCI do Hospital São Bernardo (HSB) de Setúbal, e três do Hospital das Caldas da Rainha (HCR).

Entre os 236 isolados, 215 foram recolhidos de amostras clínicas de diferentes pacientes hospitalizados em várias enfermarias (Tabela 1). Os restantes 21 isolados foram obtidos de estudos de colonização realizados em dois hospitais (HSJ e HSFX): 15 recolhidos do tracto superior respiratório e tracto gastro-intestinal de doentes do HSJ, e os restantes 6, obtidos da mão de um elemento do pessoal clínico, do meio ambiente (grades da cama e roupa da cama) e de doentes internados numa UCI do HSFX.

Todos os isolados foram identificados pelo Vitek System e API 20NE System (Bio Mérieux, Marcy L'Étoile, França). Tendo em consideração o elevado número de isolados e as características fenotípicas similares, apenas alguns isolados de cada hospital foram identificados pelo método molecular ARDRA (Amplified DNA Restriction Analysis), conforme metodologia descrita por Grundmann et al.6

Testes de susceptibilidade

O estudo de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos foi realizado pelo método de difusão em disco em gelose Mueller-Hinton de acordo com as normas de NCCLS10. Os antimicrobianos testados foram: b-lactâmicos (amoxicilina,

Tabela I - Distribuição das 215 estirpes de *A. baumannii* isoladas de produtos biológicos de doentes internados nos vários serviços dos seis Hospitais Portugueses

Hospital (N.º de isolados)	Serviços	Produtos biológicos					N.º de isolados
		Secreção Brônquica	Sangue	Urina	Pus	Cateter	
HSM (108)	Cirurgia	7	6	4	8		25
	Medicina	15	4	17	1	1	38
	UCIs	31	6	5	2	1	45
HSFX (64)	Cirurgia	1	1				2
	Medicina	8		10		1	19
	UCIs	25	4	8	2	4	43
HSJ (28)	Cirurgia	2		2			4
	Medicina	2					2
	UCIs	8		3	8	3	22
HUC (7)	Unidade de Queimados		3		4		7
HSB (5)	Medicina	1			1		2
	UCIs	1			2		3
HCR (3)	UCIs			3			3

HSM - Hospital Santa Maria; **HSFX** - Hospital S. Francisco Xavier; **HSJ** - Hospital S. José; **HUC** - Hospitais da Universidade de Coimbra; **HSB** - Hospital S. Benardo (Setúbal); **HCR** - Hospital das Caldas da Rainha
UCIs - Unidades de Cuidados Intesivos

amoxicilina-ác. clavulânico, ticarcilina, ticarcilina-ác. clavulânico, piperacilina-tazobactam, cefoxitina, cefuroxima, ceftriaxona, cefpiroma, cefepima, cefotaxima, ceftazidima, aztreonamo, imipenemo e meropenemo), aminoglicosídeos (amicacina, gentamicina), quinolonas (ácido nalidíxico, norfloxacina e ciprofloxacina) e polimixina B.

As concentrações mínimas inibitórias (CMIs) de catorze b-lactâmicos foram determinadas pelo método de E-teste (AB Biodisk, Solna, Suécia), nomeadamente amoxicilina, amoxicilina-ác. clavulânico (2:1), ticarcilina, ticarcilina-ác. clavulânico (2 mg/mL), piperacilina, piperacilina-tazobactam (4 mg/mL), ampicilina-sulbactam (2:1) cefoxitina, ceftriaxona, ceftazidima, cefpiroma, cefepima, aztreonamo e imipenemo.

Electroforese em gel de agarose em campo pulsado (PFGE)

Noventa e quatro isolados foram seleccionados para análise dos perfis de restrição do DNA cromossomal com a enzima de restrição ApaI (New England Biolabs) e obtidos por PFGE, realizado como descrito previamente[11]. Foram incluídos os isolados recolhidos do pessoal clínico e meio ambiente. Os fragmentos de restrição foram separados por electroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE 0,5x, pH 8,0 (45mM Tris-HCl, 45 mM ácido bórico, 1 mM EDTA) num aparelho CHEF DRII (Bio-Rad) a 200V a 15 ºC durante 24h, com pulsos de 5 a 15 s. Os geis foram corados com brometo de etídio. Utilizou-se como padrão de peso molecular o MidRange II PFG Marker (New England Biolabs). Os resultados obtidos foram interpretados de acordo com os critérios descritos por Tenover et al. [12]

Tipificação por PCR

Os mesmos isolados foram estudados por métodos de tipificação baseados na reacção de amplificação em cadeia (PCR). Para o M13-PCR foi usado como oligonucleótido ou "primer" iniciador uma região interna do bacteriófago M13, usando-se as mesmas condições de amplificação de Grundmann et al.[6]

Para o MSP-PCR as sequências repetitivas do DNA foram amplificadas usando um conjunto de três "primers": "primer" A - 2MS (YTAGCAGCAGCAGCAGC), "primer" B - (GACA)5 e "primer" C - (GTGC)4. As amplificações decorreram num termociclador Thermo RoboCycler (Stratagene) em tubos de 0,2 ml com mistura (25 ml cada) contendo tampão PCR 1X, 2,5 mM MgCl2, 0,2 mM de dNTPs, 50 pmol de cada "primer" e 2 U de Taq DNA polimerase (Gibco BRL). As reacções de amplificação decorreram nas seguintes condições: ciclo inicial de 94ºC/3 min, 35 ciclos de 94ºC/1 min, 50ºC/1 min, 72ºC/2 min e uma extensão final de 72ºC/7 min. Uma alíquota de 10 ml da mistura de amplificação foi misturada com 1 ml de tampão de carga e separada por electroforese em gel agarose a 1% em TBE 0.5x, pH 8,0 a 90 volts durante 2 horas e 30 min. Os geis foram corados com brometo de etídio e fotografados.

RESULTADOS

Identificação

Todos os isolados foram classificados no complexo Acinetobacter calcoaceticus-A. baumannii pelos métodos de identificação fenotípicos. Por ARDRA os isolados foram identificados como A. baumannii, mostrando um perfil de bandas igual ao da estirpe tipo A. baumannii ATCC 19606T.

Infecção e colonização

A Tabela 1 mostra a distribuição dos 215 isolados clínicos de A. baumannii provenientes de várias enfermarias de seis hospitais. Cento e vinte e três (57,2 %) foram encontrados em UCIs, enquanto, os restantes 92 foram isolados nas enfermarias de Medicina Interna e Cirurgia. Cinquenta e duas estirpes (24,2%) foram isoladas de urinas, 24 (11,2%) de hemoculturas, 101 (47%) de expectorações e secreções brônquicas e as restantes 38 (17,7 %) de outros produtos biológicos.

No HSJ foi implementado um estudo epidemiológico na Unidade de Neurocirurgia, onde foram estudados 20 doentes, nos quais já tinham sido encontrados isolados de A. baumannii. Onze destes pacientes apresentavam A. baumannii no tracto respiratório superior e/ou tracto digestivo, num total de 15 isolados (fos-

Tabela II - Distribuição dos 94 isolados, representativos das 236 estirpes multiresistentes de A. baumannii encontradas em seis Hospitais Portugueses, de acordo com os perfis obtidos pelas técnicas moleculares de tipificação PFGE and M13-PCR

Hospital*	N.º isolados	Data da Colheita (mês/ano)	PFGE** / M13-PCR***							
			A1/a1	A1/b1	A2/a1	A2/b2	A2/c	A3/a1	A3/a2	A3/a3
HSM	38	10/98 - 9/00	37					1		
HSFX	20	2/99 - 3/01	13					2	1	4
HSJ	21	8/00	14	1	4	1	1			
HUC	7	1-3/99						7		
HSB	5	7-9/00	5							
HCR	3	11/99 - 2/00	3							

* **HSM** - Hospital Santa Maria; **HSFX** - Hospital S. Francisco Xavier; **HSJ** - Hospital S. José; **HUC** - Hospitais da Universidade de Coimbra; **HSB** - Hospital S. Benardo (Setúbal); **HCR** - Hospital das Caldas da Rainha

** **PFGE** - Electroforese em gel de agarose em campo pulsado *** **M13-PCR** - Reacção de amplificação em cadeia (PCR) com primer M13

sas nasais n=7; garganta n=2, recto n=6). Também no HSFX, do estudo efectuado numa Unidade de Cuidados Intensivos Médicos, verificou-se a existência de dois isolados identificados das colheitas ao meio ambiente (grades da cama e respectiva roupa), um isolado das mãos de um elemento do pessoal clínico e três isolados recolhidos da garganta e espaço interdigital de três dos 6 doentes internados nesta Unidade.

Perfis de susceptibilidade

Todos os isolados apresentavam o mesmo perfil de multirresistência, incluindo resistência aos b-lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas, apresentando apenas susceptibilidade à polimixina B. As CMIs obtidas confirmaram a elevada resistência observada aos b-lactâmicos. Para a associação ampicilina-sulbactam e cefepima as CMIs estavam compreendidas entre 32 e 96 mg/L. A CMI do imipenemo era superior a 32 mg/L, sendo as CMIs para os restantes b-lactâmicos superiores a 256 mg/L.

Perfis de restrição do DNA cromossomal

Após a análise dos perfis de restrição do DNA cromossomal por PFGE verificou-se um único perfil, denominado perfil A. No entanto alguns isolados apresentaram variações em uma ou duas bandas relativamente ao perfil A e foram designados arbitrariamente A1, A2, e A3, como mostra a Figura 1. De acordo com a Tabela 2, o perfil A1 (Fig. 1, linhas 1 a 6) predominava entre os isolados de A. baumannii identificados em cinco hospitais, com excepção dos da UQ dos HUC, que exibiam o perfil A3 (Fig. 1, linhas 7 a 11). Este perfil A3 também foi encontrado nos isolados recolhidos no estudo epidemiológico do HSFX. Neste hospital, apesar deste perfil ser mais frequente no final do estudo, foi também observado no início, em conjunto com o perfil A1. Em contraste, no HSM o perfil A3 foi apenas observado num isolado recolhido da expectoração de um doente internado numa Unidade de Cuidados Intensivos Respiratórios. Os quinze isolados, encontrados no estudo de colonização efectuado aos 20 doentes no HSJ, distribuíram-se pelos perfis A1 e A2, coincidentes com os perfis dos isolados identificados na urina, pus e/ou expectoração dos respectivos doentes.

Perfis electroforéticos obtidos por PCR

Pelo método M13-PCR obtiveram-se três perfis de bandas de DNA diferentes designados a, b e c (Fig. 2). Os perfis a e b foram ainda subdivididos nos grupos a1/a2/a3 e b1/b2 com base nas variações de uma banda relativamente ao perfil mais comum. De acordo com a Tabela 2, o perfil a1 foi encontrado em 86 isolados (91,5%) e em todos os hospitais, enquanto os restantes distribuíram-se minoritariamente pelos hospitais HSJ e HSFX .

Para cada um dos "primers" A, B e C usados no MSP-PCR apenas se observou um perfil, denominado I, como mostra a Figura 3.

CONCLUSÕES

Durante um período de três anos, um número significativo de infecções e/ou colonizações associadas a estirpes multiresistentes de A. baumannii foi observado em seis hospitais portugueses. Este facto sugeriu a ocorrência de um ou mais surtos infecciosos em cada hospital.

O presente estudo mostrou que o perfil de resistência aos antibióticos observado entre os isolados era concordante com os perfis determinados por PFGE e pelas técnicas de amplificação por PCR (M13-PCR e MSP-PCR). O antibiograma poderá contribuir na diferenciação de estirpes en-

volvidas num surto, especialmente se surgir um novo fenótipo de resistência[13]. Contudo, os resultados do anti-biograma devem ser interpretados com cuidado uma vez que diferentes estirpes podem mostrar o mesmo antibiograma [13,14].

Os isolados incluídos neste estudo foram caracterizados por PFGE e mostraram um único perfil, designado perfil A. Com base na diferença de uma ou duas bandas, os perfis foram agrupados posteriormente em A1, A2 e A3, sugerindo que os isolados dos vários hospitais estavam estreitamente relacionados entre si, segundo os critérios descritos por Tenover et al[12]. A análise de perfis de macro-restrição obtidos por PFGE tem sido descrita como o método de tipificação mais discriminatório e tem sido utilizada na caracterização epidemiológica de várias espécies bacterianas inclusive Acinetobacter spp.[1,8]. É, no entanto, um método moroso e dispendioso[15]. Com o intuito de se encontrar um método alternativo de fácil execução, de modo a ser implementado nos laboratórios hospitalares, usaram-se duas técnicas baseadas na reacção de amplificação em cadeia (PCR) com diferentes "primers": MSP-PCR e M13-PCR.

Na técnica de MSP-PCR, os "primers" usados neste estudo, os motivos poli-tetranucleótidos, nunca foram ensaiados na tipificação de Acinetobacter spp., mas têm sido utilizados na tipificação de Haemophilus influenza e de diferentes espécies de fungos[16,17]. Quando as sequências repetidas são pequenas (entre 1 a 6 nucleótidos) é frequentemente aplicado o termo "short sequence repeats" (SSRs), embora estas sequências tenham sido inicialmente denominadas micro-satélites, MS[18]. Várias sequências repetidas de DNA têm sido encontradas em diversos microrganismos. As SSRs podem estar dispersas pelo genoma ou localizadas num determinado local "fixo". As unidades repetitivas de um determinado locus variam em número de estirpe para estirpe e estão envolvidas em mecanismos de regulação de genes. No presente trabalho, este método não revelou poder discriminatório suficiente entre os isolados de A. baumannii em estudo, dado

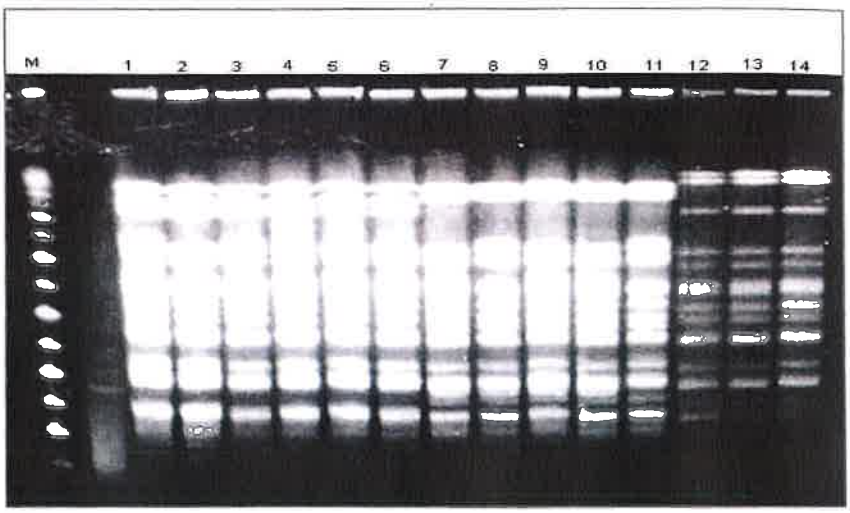


Figura 1

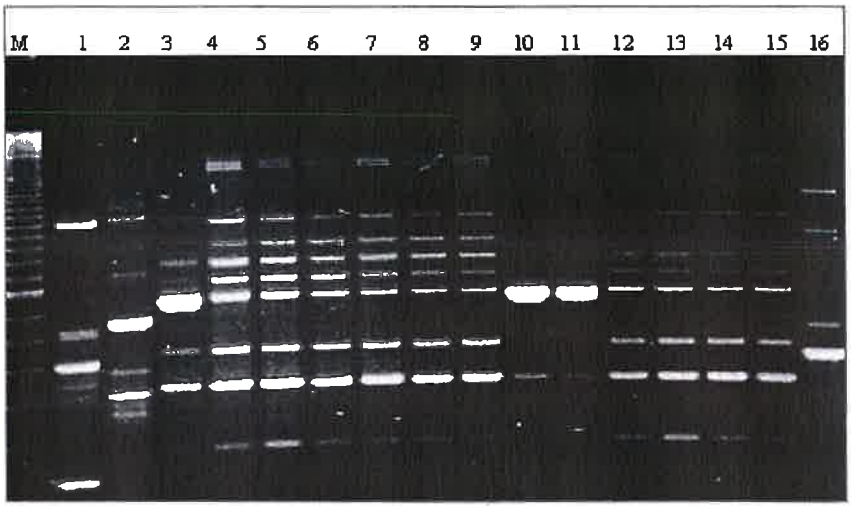


Figura 2

que apenas se observou um perfil para cada um dos "primers" utilizados.

A técnica M13-PCR baseia-se na amplificação de sequências conservadas existentes no DNA genómico com um único "primer" M13. A análise do perfil electroforético permitiu observar bandas distintas, com apenas um número reduzido de bandas secundárias, o que facilitou a comparação dos perfis electroforéticos. Este resultado está em acordo com os obtidos por Grundmann et al.[6] que compararam os resultados obtidos com o "primer" M13 e com outros "primers" (DAF4, REP1+REP2 e ERIC-2). Entre os isolados A. baumannii foi possível observar três perfis (a, b e c), dos quais o perfil a foi predominante. Esta técnica mostrou um poder discriminatório superior ao MSP-PCR e os resultados podem ser obtidos em 48h.

Numerosos estudos de surtos causados por Acinetobacter spp. multiresistentes envolvem um único hospital[4,5,9]. Apenas no Brasil e nos Estados Unidos foi detectada a presença de A. baumannii em vários hospitais simultaneamente[7,19]. O presente estudo demonstrou a disseminação de um clone de A. baumannii multiresistente nos seis hospitais portugueses, provavelmente facilitada pela transferência de doentes entre Hospitais Centrais e Distritais e vice-versa. A estirpe responsável pelos surtos nos vários hospitais, não estava confinada a um serviço, com excepção dos HUC, on-

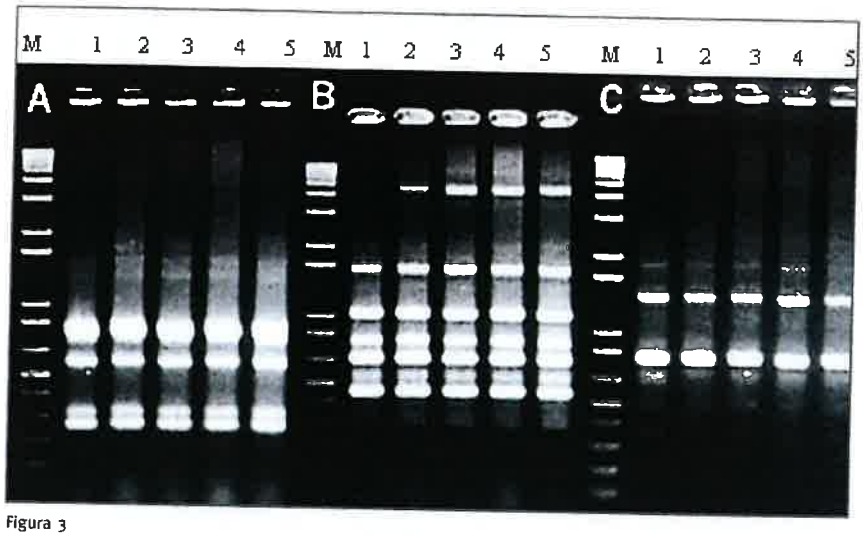


Figura 3

de se identificou na UQ, até Março de 1999. A transferência de pacientes de UCIs (57,2% dos isolados foram encontrado em UCIs) para outros serviços poderá contribuir para a disseminação intra-hospitalar deste clone.

A colonização por Acinetobacter spp. em indivíduos não hospitalizados é normalmente baixa. Em contraste, os doentes hospitalizados apresentam uma maior percentagem de colonização especialmente durante surtos infecciosos1. Apesar de terem sido implementadas medidas de controlo da infecção, a disseminação intra e inter-hospitalar das estirpes de A. baumannii poderá ser justificada pelo facto das estirpes serem multiresistentes o que permite a colonização dos doentes, com a subsequente contaminação do pessoal hospitalar e das superfícies ambientais.

Em conclusão, o presente estudo mostra a emergência de infecções nosocomiais devidas a uma estirpe endémica multiresistente de A. baumannii. Por três métodos de tipificação, PFGE, M13-PCR e MSP-PCR, foi possível demonstrar a disseminação clonal intra e inter-hospitalar em seis hospitais portugueses durante três anos, o que indica a necessidade de contínuos estudos epidemiológicos, incluindo a caracterização molecular de estirpes nosocomiais, de forma a implementar medidas efectivas de controlo da infecção hospitalar.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos Directores dos Laboratórios de Microbiologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra, Caldas da Rainha e Setúbal pela cedência dos isolados. Este estudo foi parcialmente suportado financeiramente pelo "Programa de Investigação Integrada" da Universidade de Lisboa e ADEIM (Associação para o Desenvolvimento do Ensino e Investigação da Microbiologia).

AUTOR CORRESPONDENTE

Aida Duarte, Laboratório de Microbiologia. Faculdade de Farmácia. Av. Forças Armadas 1649-019. Lisboa. Tel.:351 21 7946440. Fax: 351 21 7934212. E-mail: aduarte@ff.ul.pt.

BIBLIOGRAFIA

1. Bergogne-Bérézin E, Towner KJ. Acinetobacter spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical and epidemiological features. Clin. Microbiol. Rev. 1996; 9: 148-165.
2. Berlau J, Aucken H, Malnick H, Pitt T. Distribution of Acinetobacter species on skin of healthy humans. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1999; 18: 179-183
3. Forster DH, Daschner FD. Acinetobacter species as nosocomial pathogens. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1998; 17: 73-77.
4. Webster CA, Crowe M, Humphreys H, Towner KJ. Surveillance of an adult intensive care unit for long-term persistence of a multi-resistant strain of Acinetobacter baumannii. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1998; 17: 171-176.
5. Bou G, Cerveró G, Angeles Domínguez M, Quereda C, Martínez-Beltrán J. Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant Acinetobacter baumannii strain with a carbapenem hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in A. baumannii is not due solely to the presence of b-lactamases. J. Clin. Microbiol. 2000; 38: 3299-3305
6. Grundmann HJ, Towner KJ, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Maher M, Seifert H, Vaneechoutte M. Multicenter study using standardized protocols and reagents for evaluation of reproducibility of PCR-based fingerprinting of Acinetobacter spp. J. Clin. Microbiol. 1997; 35: 3071-3077.
7. Sader HS, Mendes CF, Pignatari AC, Pfaller MA. Use of macrorestriction analysis to demonstrate interhospital spread of multiresistant Acinetobacter baumannii in São Paulo, Brazil. Clin. Infect. Dis. 1996; 23: 631-634.
8. Seifert H, Schulze A, Baginski R, Pulverer G. Comparison of four different methods for epidemiology typing of Acinetobacter baumannii. J. Clin. Microbiol. 1994; 32: 1816-1819
9. Struelens MJ, Carlier E, Maes N, Serruys E, Quint WGV, van Belkum A. Nosocomial colonization and infection with multiresistant Acinetobacter baumannii: outbreak delineation using DNA macrorestriction analysis and PCR-fingerprinting. J. Hosp. Infect. 1993; 25:15-32
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards 2000 Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing, Ninth Informational Supplement M100-S9. NCCLS, Wayne, PA.
11. Maslow JN, Slutsky AM, Arbeit RD. Application of pulsed-field gel electrophoresis to molecular epidemiology. In Diagnostic molecular microbiology: principles and applications. Persing, D. H., Smith, T. F., Tenover, F. C. & White, T. J., Eds. 1993 pp. 563-572. American Society for Microbiology, Washington, D.C. Habor, N: Y:
12. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J. Clin. Microbiol. 1995; 33: 2233-2239..
13. Marcos MA, Abdalla S, Pedraza F, Andreu A, Fernandez F, Gomez-Lus R, Jimenez de Anta MT, Vila J. Epidemiological markers of Acinetobacter baumannii clinical isolates from a spinal cord injury unit. J. Hosp. Infect. 1994; 28: 39-48.
14. Barroso H, Freitas-Vieira A, Lito LM, Melo Cristino J, Salgado MJ, Ferreira H, Sousa JC, Soveral-Rodrigues G, Moura T, Duarte A. Survey of Klebsiella pneumoniae producing extended-spectrum b-lactamases at a Portuguese hospital: TEM-10 as the endemic enzyme. J. Ant. Chemother. 2000; 45: 611-616.
15. Olive Michael D, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. Journal Clinical Microbiology 1999; 37, 1661-1669.
16. Martin F, Costa G, Delarmelle C, Diez J. Genomic fingerprinting of ectomycondrial fungi by microsatellite primed PCR, In Mycorrhiza Manual. Varme, A. Eds. pp. 1998; 463-474. Springer Berlin.
17. Van Belkum A, Scherer S, van Alphen L, Verbrugh H. Short-Sequence DNA Repeats in Prokaryotic Genomes. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1998; 62: 275-293
18. Van Belkum A. The role of short sequence repeats in epidemiologic typing. Curr. Op. Microbiol. 1999; 2: 306-311
19. Manikal VM, Landman D, Saurina G, Oydna E, Himal L, Quale J. Endemic Carbapenem-Resistant Acinetobacter Species in Brooklyn, New York: Citywide Prevalence, Interinstitutional Spread, and Relation to Antibiotic Usage. Clinical Infectious Diseases 2000;