ARTIGO ORIGINAL / *ORIGINAL ARTICLE*

Investigação do perfil genotípico de estirpes de *Acinetobacter calcoaceticus baumannii complex* por PFGE e o seu possível envolvimento no primeiro surto do Hospital Pedro Hispano

Genotypic characterization of strains of Acinetobacter calcoaceticus baumannii complex *by PFGE eventually involved in the first cluster at Hospital Pedro Hispano*

/ Cavaleiro L.

Técnica Superior de Saúde, Serviço de Patologia Clínica, Hospital Pedro Hispano, Matosinhos, Portugal

Correspondência:
Luísa Cavaleiro
Serviço de Patologia Clínica
Hospital Pedro Hispano
Rua Dr. Eduardo Torres,
4454-509 Matosinhos
e-mail: luisacavaleiro@gmail.com

/ Resumo

Este estudo investigou, pela metodologia de electroforese em campo pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*-PFGE), a relação clonal entre as estirpes de *Acinetobacter calcoaceticus baumannii complex*, isoladas no laboratório de Microbiologia do Hospital Pedro Hispano (HPH) no contexto de um surto hospitalar. Os microrganismos multirresistentes foram caracterizados relativamente à sua resistência aos carbapenemes, investigando a presença de carbapenemases, por PCR multiplex.

Concluiu-se que as estirpes eram iguais genotipicamente, pertencendo ao mesmo clone, o que confirma que houve transmissão, sendo o agente implicado no primeiro surto do HPH por *Acinetobacter calcoaceticus baumannii complex* multirresistente.

Palavras-chave: *Acinetobacter calcoaceticus baumannii complex* multirresistente, surto hospitalar, PFGE

/ Summary

We investigated, by Pulsed Field Gel Electrophoresis-PFGE, the clonal relateness between Acinetobacter calcoaceticus baumannii complex strains, isolated in Microbiology laboratory from Hospital Pedro Hispano (HPH), in a context of an hospitalar outbreak. Multi-drug resistant isolates were characterized in their carbapenemen resistance by PCR multiplex.

The conclusions were that the Acinetobacter calcoaceticus baumannii complex strains, isolated were genetically related, confirming the transmission, and beeing responsable for the first outbreak occured in HPH of Acinetobacter calcoaceticus baumannii complex multi-drug resistant.

Key-words: *Acinetobacter calcoaceticus baumannii complex multi-drug resistant, hospital outbreak, PFGE*



Figura 1 - Linhas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10 e 11 "pulsotipo" de 9 estirpes de *Acinetobacter calcoaceticus baumannii complex* obtidos por digestão com Apa I usando um protocolo standardizado para PFGE. Linhas 1, 8 e 12 marcador de pesos moleculares ADN (marcador ADN 100 pb, Promega®).



Figura 2 - Detecção de genes codificadores de carbapenemases por PCR multiplex. Linhas 2, 3, 4 estirpes de *Acinetobacter calcoaceticus baumannii complex* com Oxa- 40-like. Linha 5 controlo positivo Oxa- 40-like. Linhas 7, 8, 9 isolados de *Acinetobacter calcoaceticus baumannii complex* com Oxa- 51-like e Oxa-23-like. Linha 10 controlo positivo Oxa-51-like (mais pequena) e Oxa-23-like (maior). Linhas 1 e 6 marcador de pesos moleculares ADN (marcador ADN 100 pb, Promega®).

/ Introdução

O *Acinetobacter spp* tem uma presença ubíqua na natureza, encontrando-se frequentemente no solo e na água. Também pode ser isolado da pele de indivíduos saudáveis, em particular nos profissionais da saúde [1].

O género *Acinetobacter* caracteriza-se como cocobacilos de Gram negativo geralmente com arranjo diplóide ou em cadeias de tamanho variável, aeróbio estrito, não fermentador da glucose e não fastidioso. São catalase positivo e oxidase negativo [2].

Existem várias espécies de *Acinetobacter* e todas podem causar doença no Homem, sendo o *Acinetobacter calcoaceticus baumannii complex* responsável por cerca de 80% das infecções reportadas ao CDC [3]. É um patogéneo pulmonar invasivo, com uma taxa de mortalidade que varia, segundo a literatura, entre 30 a 75%. As infecções do tracto urinário, meningites, bacterémias primárias e infecções de feridas cirúrgicas são em geral de baixa virulência. A idade avançada, a doença pulmonar crónica, a imunossupressão, o número de dias de internamento em cuidados intensivos, o uso prévio de antibióticos, os dias de intubação e ventilação mecânica, têm sido apontados como factores de risco para colonização ou infecção por *Acinetobacter calcoaceticus baumannii complex* multirresistente [4]. A capacidade do *Acinetobacter calcoaceticus baumannii complex* adquirir genes de resistência aos antimicrobianos é extremamente rápida conduzindo a perfis de multirresistência [5], este fenómeno é reportado desde 1970 [2]. O rápido desenvolvimento de resistência é resultante da sua capacidade de responder rapidamente a desafios induzidos pelos antibióticos, associado ao seu generalizado e elevado uso, em particular de cefalosporinas de largo espectro, quinolonas e carbapenemos [4]. É um patogénio nosocomial responsável por surtos, associados a estirpes multirresistentes, em vários hospitais portugueses; muitos dos quais originados por um único clone da bactéria [6,7].

Estudos indicam que existem vários clones *A. baumannii* que circulam na Europa [8] sendo necessário e urgente um melhor conhecimento e compreensão da diversidade desses clones emergentes [9].

O estudo molecular desempenha um importante papel no conhecimento epidemiológico do *Acinetobacter calcoaceticus baumannii complex* e consequentemente no controlo e vigilância das infecções nosocomiais [2].

Pretende-se avaliar, pela metodologia de PFGE, a relação clonal entre as estirpes de *Acinetobacter calcoaceticus baumannii complex* isoladas no laboratório de Microbiologia do Hospital Pedro Hispano (HPH) no decurso de um surto de infecção hospitalar durante os meses de Julho e Agosto de 2006.

/ Material e Métodos

Características dos pacientes/ Caracterização do surto

Em Julho 2006 foram identificados dois doentes, na Unidade de Cuidados intermédios Cirúrgicos (UCIC), com infecção por *Acinetobacter calcoaceticus baumannii complex* multirresistente (Caso 1, Caso 2). Por análise destes dois processos constatou-se um possível contacto na UCIC com um doente proveniente doutra Unidade Hospitalar, na qual o *Acinetobacter calcoaceticus baumannii complex* multirresistente é frequentemente causa de infecção nosocomial (endémico), e que faleceu sem terem sido efectuados exames microbiológicos. Este doente foi identificado como Caso Índex (Caso 0).

Como medidas profiláticas, foi efectuado o rastreio de colonização por *Acinetobacter calcoaceticus baumannii complex* em todos os doentes da UCIC e fechada a admissão a novos doentes. Os doentes foram colocados em isolamento de contacto/coortes de isolamento, e foram efectuadas recomendações de controlo de infecção aos profissionais de saúde.

Em Agosto 2006 aparecimento de 8 novos casos:

- Caso 3, doente da Cirurgia B que estabeleceu contacto na UCIC com os casos 1 e 2;
- Caso 4, doente da Cirurgia B;
- Caso 5, doente da UCIC;
- Caso 6, doente da Cirurgia C que estabeleceu contacto na UCIC;
- Caso 7, doente da Cirurgia C;
- Caso 8, doente da Cirurgia C;
- Caso 9, doente da Cirurgia C;
- Caso 10, doente da Medicina. Num contexto de surto admitiu-se que a estirpe isolada neste doente estaria relacionada com os restantes casos. Deu-se o alerta desencadeando as medidas de controlo de infecção já implementadas. Posteriormente verificou-se que os perfis genotípico e fenotípico não eram sobreponíveis com os das restantes estirpes.

Os doentes tinham idades compreendidas entre os 57-78 anos e permanência prolongada em ambiente hospitalar.

Medidas terapêuticas adoptadas

Foram implementadas medidas de controlo de infecção, as feridas dos doentes foram irrigadas com 2,5 – 5,0 mg Polimixina B e foi administrada Colistina 2,5 – 5,0 mg/kg/dia até um máximo de 300 mg durante 14 dias.

Microrganismos

Foram analisadas oito estirpes de *Acinetobacter calcoaceticus baumannii complex* identificadas no laboratório de microbiologia do HPH, durante os meses de Julho e Agosto de 2006 e correspondentes aos casos 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10.

Identificação bacteriana e testes de susceptibilidade aos antimicrobianos

As estirpes foram repicadas para Gelose de sangue (GS) e incubadas a 37 ºC durante 14-18 h em aerobiose. Foram efectuadas duas passagens para assegurar a pureza das culturas.

Os microrganismos foram todos identificados de acordo com a sua morfologia de Gram negativo e caracterizados fenotipicamente por reacções bioquímicas no equipamento utilizado por rotina no laboratório de microbiologia (Vitek2, BioMérieux®).

A susceptibilidade aos antimicrobianos foi testada no mesmo equipamento Vitek 2, recorrendo às cartas de susceptibilidade N037 e N022.

Avaliação da relação genotípica dos isolados

Procedeu-se à execução da digestão por enzima de restrição do ADN total bacteriano, seguida de electroforese em campo pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*-PFGE) para determinação do perfil genotípico dos microrganismos em estudo. A metodologia usada foi adaptada do protocolo descrito por Bannerman *et al* [10,11] de acordo com os procedimentos que passo a citar.

Preparação das suspensões bacterianas: com ansa estéril removeu-se da placa de GS a cultura, e suspendeu-se no tubo de plástico rolhado com 1 ml de CSB (suavemente de forma e minimizar produção de aerossóis); ajustou-se a absorvância das suspensões a 1.35, em espectrofotómetro a 610 nm; distribuiu-se 1ml CSB/estirpe e adicionou-se 5 µl de cada suspensão.

Preparação dos discos de agarose: preparou-se 1.5 % SeaPlaque no tampão de suspensão (CSB) (0,03 g agarose em 2 ml CSB); em eppendorf vazio aquecido a 42 ºC, colocou-se 200 µl da suspensão (com DO ajustada e previamente agitada); adicionou-se 10 µl da solução de Proteinase k (20 mg/ml); adicionou-se 200 µl de agarose fundida e homogeneizou-se com a ponta da pipeta; depositou-se a mistura em volumes de 20 µl sobre a parafilme, cobriu-se com lâmina e solidificaram-se os discos (- 20 ºC/5 min e 10 min à TA).

Lise celular nos discos de agarose: em tubo de plástico com a identificação da estirpe adicionou-se 5 ml tampão de lise e 25 µl Proteinase k (20 mg/ml); colocaram-se os discos nos tubos rolhados. Incubou-se em banho de água a 55 ºC, 16 h com agitação constante (150-175 rpm).

Lavagem dos discos depois da lise: a cada tubo adicionaram-se 20 ml de água ultrapura estéril aquecida e colocou-se em agitador, 10-15 min, retirou-se a água (duas lavagens); a cada tubo adicionaram-se 10 ml de tampão TE 1X e colocou-se em agitador, 30 min, retirou-se o tampão (cinco lavagens).

Restrição e digestão: lavou-se o disco durante 20 min com 100 µl tampão de restrição da enzima Apa I x1 (duas lavagens); adicionou-se 100 µL do tampão de restrição da enzima NE 1X, 1 µl de BSA (10000 µg/mL) e a Apa I (20 U por disco); incubou-se a 25 ºC durante a noite; parou-se a reacção com 2.5 µl de loading buffer.

Electroforese: preparou-se gel agarose (Seakem LE a 1.0 % em TBE 0.5X): 1.5 g de agarose em 150 ml TBE 0.5X aqueceu-se, sem ferver, no microndas até a agarose estar completamente dissolvida; programou-se no aparelho CHEF DRIII Biorad as condições da corrida: temperatura 14 ºC; voltagem 6 V/cm; tempo inicial 5 sec; tempo final 13 sec; tempo de corrida 20 h; o fim da corrida é assinalado no *écran* do equipamento (*off*); desligou-se a bomba e o sistema de refrigeração; corou-se o gel em Brometo de etídio: 75 µl BE (10 mg/ml) + 1000 ml água destilada ultrapura durante 45 min; fotografou-se.

Preparação de reagentes:

1) Tampão de suspensão (CSB) (100 mM Tris:100 mM EDTA, pH 8.0):
para 150 discos, prepararam-se 200 ml do seguinte modo:

- 20 ml de 1 M Tris, pH 8.0 ;
- 40 ml de 0.5 M EDTA, pH 8.0;
- diluiu-se até 200 ml com água ultrapura estéril;
- autoclavou-se.

2) Tampão de lise (50 mM Tris:50 mM EDTA, pH 8.0 + 1% Sarcosyl):

- 25 ml de 1 M Tris, pH 8.0 ;
- 50 ml de 0.5 M EDTA, pH 8.0 ;
- 5 g de Sarcosyl (N-Laurylsarcosine, Sodium Salt);
- diluiu-se até 500 mL com água estéril ultrapura ;
- autoclavou-se.

3) TBE 0.5X.

QUADRO I – SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DAS ESTIRPES DE *ACINETOBACTER CALCOACETICUS BAUMANNII COMPLEX* ISOLADAS NO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA DO HOSPITAL PEDRO HISPANO (HPH) NO DECURSO DE UM SURTO HOSPITALAR.

Antibiótico	Caso 1	Caso 2	Caso 3	Caso 4	Caso 5	Caso 6	Caso 7	Caso 8	Caso 9	Caso 10
Amicacina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Aztreonamo	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
Cefepime	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
Ceftazidima	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
Ciprofloxacina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
Gentamicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Imipenemo	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
Meropenemo	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
Netilmicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Pefloxacina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
Piperacilina/Tazobactam	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
Ticarcilina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
Tobramicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Cefpiroma	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
Colistina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

R- resistente, S- sensível

PCR multiplex

Caracterização dos microrganismos multirresistentes relativamente à sua resistência aos carbapenemes, investigando a presença de carbapenemases, por PCR multiplex. A metodologia usada foi adaptada do protocolo descrito por Woodford *et al* [12].

/ Resultados

A susceptibilidade aos antimicrobianos foi testada no equipamento Vitek2 (BioMérieux®), e os resultados obtidos estão exemplificados no quadro I. O perfil de multirresistência das estirpes dos casos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 é igual sendo todas resistentes aos antibióticos testados excepto à colistina e aminoglicosideos.

O microrganismo do caso 10 apresentava susceptibilidade a todos os antibióticos testados.

A análise das bandas de PFGE do ADN cromossómico de restrição (figura 1) foi efectuada visualmente e a sua interpretação realizada de acordo com os critérios sugeridos por Tenover *et al* [13]. Estes critérios são aplicáveis desde que sejam obtidos pelo menos dez fragmentos distintos da estirpe analisada por PFGE o que aconteceu neste ensaio.

As bandas, obtidas por PFGE, das estirpes isoladas multirresistentes de *Acinetobacter calcoaceticus baumannii complex*, nos nove casos, são indistinguíveis entre si, pertencendo ao mesmo clone.

Linhas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 apresentam o mesmo "pulsotipo" pois possuem o mesmo número de bandas e com igual tamanho.

Linha 10 possui uma diferença genética com dois fragmentos diferentes, comparada com o padrão de PFGE da estirpe responsável pelo surto.

Linha 11 possui um padrão de PFGE que difere em mais de sete fragmentos comparado com o padrão de PFGE da estirpe responsável pelo surto.

A PCR *multiplex* com os *primers* para Oxa-24-like não amplificou nenhum fragmento (linhas 2, 3, 4) e amplificou no controlo positivo (linha 5).

A PCR com os *primers* para Oxa-51-like e Oxa-23-like amplificou nas linhas 7 e 8; na linha 9 amplificou fragmento Oxa-51-like; no controlo (linha 10) estão presentes os dois fragmentos (Oxa-51-like e Oxa-23-like).

/ Discussão

A preparação das moléculas de ADN para a aplicação da técnica de PFGE envolveu a imobilização das células numa matriz de agarose, de modo a evitar quebras não específicas do ADN devido à agitação mecânica [14]. A lise das células e

a extracção e purificação do ADN realizou-se com as células oclusas na matriz de agarose, seguindo-se a incubação com a enzima de restrição seleccionada.

Devido à dimensão do ADN cromossómico (tipicamente entre 800-8000 kb em bactérias), a restrição com endonucleases que reconhecem sequências de bases muito frequentes origina perfis muito complexos. Por outro lado, se a endonuclease originar poucos fragmentos, estes terão uma massa molecular muito elevada, dificultando a sua separação por electroforese convencional. A separação destes fragmentos de grandes dimensões é conseguida pela técnica de electroforese em campo pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*-PFGE). Nos métodos electroforéticos convencionais, a separação de moléculas lineares de ADN (até 50 kb) é efectuada em função da sua massa molecular, quando se aplica um campo eléctrico unidireccional. O limite de resolução é atingido quando o raio de rotação da molécula de ADN excede o tamanho médio do poro do gel forçando as moléculas a percorrer um percurso sinuoso e a mobilidade electroforética passa a ser independente da massa molecular. Na electroforese em campo pulsado, campos eléctricos alternados forçam as moléculas de ADN a mudar continuamente de direcção. Esta separação é baseada no maior tempo que moléculas de maior dimensão levam a mudar de direcção de migração. Quanto maior for a molécula de ADN, maior é o tempo necessário para a sua reorientação e é nesta diferença dos tempos de reorientação que se baseia a separação das moléculas. O parâmetro crítico que afecta a separação das moléculas é o tempo do pulso (duração da aplicação do campo eléctrico numa dada direcção).

Têm sido descritos vários equipamentos e geometrias de eléctrodos de modo a melhorar a resolução dos perfis dos macrofragmentos gerados por este tipo de electroforese.

Por ser uma técnica reprodutível e com muito bom poder discriminativo tem sido muito utilizada em estudos epidemiológicos e na distinção de estirpes clínicas das mais variadas espécies bacterianas. As suas limitações resultam do facto de ser uma técnica que exige experiência na sua aplicação, e que é dispendiosa e demorada, principalmente devido ao tratamento da amostra, já que a extracção de ADN das células exige cuidados especiais para que a quebra mecânica do ADN não afecte a sua reprodutibilidade. Exige ainda equipamento específico para electroforese de campo pulsado e enzimas de restrição.

As linhas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 apresentam o mesmo "pulsotipo". Estes isolados representam a mesma estirpe sendo esta a responsável pelo surto.

A linha 10 possui uma diferença genética com dois fragmentos diferentes, comparada com o padrão de PFGE da estirpe responsável pelo surto. Esta estirpe é clonalmente relacionada com a estirpe responsável pelo surto.

A Linha 11 possui um padrão de PFGE que difere em mais de sete fragmentos comparado com o padrão de PFGE da estirpe responsável pelo surto, o que se traduz em mais de três diferenças genéticas, logo esta estirpe não é relacionada geneticamente com a estirpe responsável pelo surto.

Estudos de Da Silva *et al* [8] identificaram por metodologia de PFGE um clone multirresistente de *Acinetobacter calcoaceticus baumannii complex* endémico em hospitais portugueses. Estirpes multirresistentes foram isoladas noutros hospitais portugueses em contexto de surto hospitalar de acordo com o publicado por Basílio *et al* [4].

As estirpes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 possuem os genes codificadores para as carbapenemases Oxa-51-like intrínseco à espécie *Acinetobacter calcoaceticus baumannii complex* [12].

As estirpes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 de *Acinetobacter calcoaceticus baumannii complex*, analisadas neste trabalho, são iguais genotipicamente, pertencem ao mesmo clone; possuem os genes codificadores para as carbapenemases Oxa-23-like, sendo o agente implicado no surto zero do HPH por *Acinetobacter calcoaceticus baumannii complex* multirresistente. Em vários hospitais portugueses emergem surtos por *A. baumannii* produtores da enzima Oxa-23-like, sendo de notar também a detecção num doente em ambulatório [15]. Este clone foi também identificado como o responsável por surtos em hospitais europeus [16,17].

No HPH o *Acinetobacter calcoaceticus baumannii complex* multirresistente não é endémico não fazendo parte da população microbiana do nosso hospital [18].

/ Conclusão

As estirpes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 de *Acinetobacter calcoaceticus baumannii complex*, analisados neste trabalho, são iguais genotipicamente, pertencem ao mesmo clone; confirmando que houve transmissão, sendo o agente implicado no primeiro surto do HPH por *Acinetobacter baumannii* multiresistente Oxa-23-like.

O estreito cumprimento das medidas de controlo de infecção sugerem o seu forte impacto no controlo de surtos de *Acinetobacter calcoaceticus baumannii complex.*

Este trabalho enfatiza a importância da existência de medidas de controlo de infecção efectivas, como a detecção precoce de pacientes colonizados, a implementação das medidas de controlo de infecção (isolamento dos doentes, lavagem das mãos, uso de luvas e máscara), o uso racional de antibióticos, e a importância de identificar e relacionar os factores epidemiológicos e biológicos que favorecem a emergência, disseminação e persistência destes microrganismos multirresistentes nos hospitais.

/ Bibliografia

1. Cisneros JM, Rodrigues-Bano J. "Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii:* epidemiology, clinical features and treatment". *Clin. Microbiol. Infect.* 2002; 8:687-693

2. Looveren V, Goossens, "ARPAC Steering Group. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter spp* in Europe". *Clin. Microbiol. Infect.* 2004; 10: 684-704

3. http://www.cdc.gov

4. Basílio C, Azevedo A, Branco A, Gomes C, Oliveira T, Coimbra I, Pereira E, Mota "A *Acinetobacter calcoaceticus baumannii complex* multirresistente em UCI Polivalente: Análise retrospectiva". *Revista Infecção e Sepsis.* 2004; 2:21-25

5. Bergogne-Berezin E, Towner KJ. "*Acinetobacter spp* as nosocomial pathogenes: microbiological, clinical and epidemiological features". *Clin. Microbiol. Rev.* 1996; 9:148-165

6. Da Silva G, Quintera S, Bertolo E *et al.* "Long term dissemination of an Oxa-40 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* clone in the Iberian Peninsula". *J. Antimicrob. Chemother.* 2004; 54:255-258

7. Lopez-Otsoa F, Gallego L, Towner KJ, Tysall L, Woodford N, Livermore DM. "Endemic carbapenem resistance associated with Oxa 40 carbapenemase among *Acinetobacter baumannii* isolates from a hospital in Northern Spain". *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40:4741-4743

8. Da Silva G, Dijkshoorn L, Reijden T, Strijen V, Duarte A. "Identification of widespread closely related *Acinetobacter baumannii* isolates in Portugal as a subgroup of European Clone II". *European Society Clin. Microbiol. Infect. Diseases.* 2007; 13:190-195

9. Seifert H, Dolzani L, Bressan R, Reijden T, Strijen B, Stefanik D, Heersma H, Dijkshoorn. L. "Standardization and interlaboratory Reproducibility Assessment of Pulsed-Field Gel Electrophoresis-Generated Fingerprints of *Acinetobacter baumannii*". *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43:4328-4335

10. Bannerman TL, Hancock GA, Tenover FC, Miller JM. "Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*". *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33:551-555

11. Ribot EM, Fitzgerald C, Kubota K, Swaminathan B, Barrett TJ. "Rapid Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocol for subtyping of *Campylobacter jejuni*". *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39:1889-1894

12. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Jane F, Turton JF, Ward ME, Browne S, Amyesc SGB, Livermore DM. "Multiplex PCR for genes encoding prevalent Oxa carbapenemases in *Acinetobacter* spp. Intern". *J. Antimicrobial Agents.* 2006; 27:351-353

13. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DDH, Swaminathan B. "Interpreting cromossomal DNA restriction patterns produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: criteria for bacterial strain typing". *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33:2233-2239

14. http://www.e-escola.pt

15. Grosso F, Quinteira S, Cavaleiro L, Peixe L. "Dissemination of Oxa-23-producing *Acinetobacter baumannii* Iberian clone in hospitals and ambulatory". *18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.* 2008. Abstract number: 0301

16. Kohlenberg A, Bruemmer S, Sohr D, Higgins P, Piening B, Rueden H, Seifert H. "Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the carbapenemase OXA-23 in a German university medical centre". *18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.* 2008; Abstract number: 0298

17. Lissoir B, Bogaerts P, Bauraing C, Deplano A, Fossion M, Bodson A, Glupczynski Y. "Outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*-producing OXA-23 carbapenemase at one Belgian acute care hospital". *18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.* 2008; Abstract number: 0297

18. http://www.ulsm.pt/patologiaclinica/

Acknowledgments/Agradecimentos

Este estudo foi levado a cabo com a colaboração do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto e da Unidade de Biologia Molecular do Hospital Geral de Santo António, Porto.