



Original

Cristina García-Salguero¹
Esther Culebras²
Adela Álvarez-Buylla¹
Iciar Rodríguez-Avial¹
Alberto Delgado-Iribarren²

Utilidad de MALDI-TOF y REP-PCR frente a PFGE para el estudio epidemiológico de *Acinetobacter baumannii*

¹Servicio de Microbiología Hospital Universitario Clínico San Carlos, IdISCC e IML, Madrid.

²Servicio de Microbiología Hospital Universitario Clínico San Carlos, IdISCC, IML y Universidad Complutense, Madrid.

Article history

Article history: Received 24 November 2020; Revision Requested: 4 December 2020; Revision Received: 15 February 2021; Accepted: 15 February 2021; Published: 8 April 2021

RESUMEN

Objetivo. Evaluar la capacidad de MALDI-TOF MS (*Matrix-assisted Laser Desorption-Ionization Time Of Flight*) y rep-PCR para discriminar diferentes clones de *Acinetobacter baumannii*.

Material y métodos. Se incluyeron en el estudio 21 aislados de *A. baumannii* con diferentes características epidemiológicas y fenotípicas. Todas las muestras se analizaron en paralelo por MALDI-TOF MS y rep-PCR y los espectros obtenidos se compararon entre ellos y con los resultados obtenidos mediante electroforesis en campo pulsado (PFGE). Se consideró que los aislados con una similitud igual o superior al 87% formaban parte del mismo grupo clonal.

Resultados. El análisis de los 21 aislados incluidos en el estudio, dio lugar a 9 grupos clonales en PFGE, 3 grupos en MALDI-TOF MS y 7 grupos en el análisis mediante rep-PCR. Los aislados que formaban los diferentes grupos por las 3 técnicas utilizadas eran totalmente diferentes, por lo que se puede concluir que no hay equivalencia entre los resultados obtenidos con los tres métodos de tipado utilizados.

Conclusiones. A pesar de su simplicidad ni MALDI-TOF MS ni rep-PCR pueden sustituir en este momento al PFGE para el estudio epidemiológico de *A. baumannii*.

Palabras clave: *A. baumannii*, carbapenemasa, epidemiología, MALDI-TOF MS y rep-PCR.

Usefulness of MALDI-TOF and REP-PCR against PFGE for the epidemiological study of *Acinetobacter baumannii*

ABSTRACT

Objective. To evaluate the ability of MALDI-TOF MS and rep-PCR to discriminate *Acinetobacter baumannii* clones.

Material and methods. A total of 21 strains of *A. baumannii* with different epidemiological and phenotypic characteristics were included in the study. All isolates were analyzed in parallel by MALDI-TOF MS and rep-PCR and the spectra obtained were compared with each other and with the results obtained by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). Isolates with a similarity equal to or greater than 87% were considered to be part of the same clonal group.

Results. The analysis of the 21 isolates included in the study, resulted in 8 clonal groups using PFGE, 3 groups by MALDI-TOF MS and 7 groups by rep-PCR analysis. The isolates that formed the different groups by the 3 techniques used were totally different, so it can be concluded that there is no equivalence between the results obtained with the three typing methods used.

Conclusions Despite its simplicity, neither MALDI-TOF MS nor rep-PCR can at this time replace PFGE for the epidemiological study of *A. baumannii*.

Key-words: *A. baumannii*, carbapenemase, epidemiology, MALDI-TOF MS and rep-PCR.

INTRODUCCIÓN

La infección nosocomial es uno de los principales problemas sanitarios en todo el mundo y supone una causa importante de morbi-mortalidad, aumento de los días de ingreso y por tanto de los costes. Afecta al 5-10% de los pacientes ingresados y un porcentaje elevado de las mismas es evitable [1,2].

Correspondencia:
Cristina García Salguero
Servicio de Microbiología Hospital Universitario Clínico San Carlos.
Calle Profesor Martín Lagos s/n, 28040, Madrid
E-mail: crigarsal@gmail.com

Todos los patógenos pueden estar implicados en las infecciones nosocomiales, sin embargo los problemas más graves se circunscriben a un número reducido de especies. Entre estos patógenos nosocomiales, *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos merece especial atención por su capacidad de propagación y escaso arsenal terapéutico disponible para su tratamiento. Por ello, el 27 de Febrero de 2017, la OMS publicó una lista de patógenos prioritarios para promover el desarrollo I+D de nuevos antibióticos en la que ha situado a *A. baumannii* resistente a carbapenémicos como prioridad 1, crítica [3].

El método más eficaz para la prevención y el correcto manejo de la infección nosocomial pasa por el diseño, desarrollo y validación de las técnicas microbiológicas para la detección precoz de los patógenos nosocomiales y el tipado de las cepas implicadas con objeto de determinar su relación epidemiológica [4].

La electroforesis in campo pulsado (PFGE) es considerada actualmente el "gold standard" para la tipificación bacteriana. Esta técnica permite separar fragmentos de ADN de elevado peso molecular incluidos en un gel de agarosa mediante la alternancia de un campo eléctrico entre diferentes pares de electrodos. Esta y otras técnicas de las que se dispone actualmente, aunque útiles, son muy laboriosas. Por ello, el desarrollo de métodos simples y eficaces que permitan agilizar estos procesos es prioritario.

La espectrometría de masas MALDI-TOF MS, se ha utilizado durante años en el campo de la química, pero no ha sido hasta mediados de los años 70 cuando se ha empezado a introducir en la microbiología. En la actualidad se emplea en un número creciente de laboratorios en España para la identificación bacteriana. El número de especies bacterianas que pueden identificarse es cada vez más amplio. Actualmente es posible distinguir entre *A. baumannii* y las diferentes especies que constituyen el complejo *A. baumannii*-*A. calcoaceticus*, las cuales pueden estar también implicadas en infección nosocomial. La distinción de las especies es muy importante ya que el perfil de resistencias es muy diferente entre unas y otras.

Aunque la aplicación mencionada es la más extendida del sistema, la espectrometría de masas MALDI-TOF MS tiene otras posibles aplicaciones en el campo de la microbiología entre las que cabe destacar: la detección de resistencia a antibióticos y la tipificación molecular [4].

En este sentido, la rapidez con la que la espectrometría de masas es capaz de analizar los aislados bacterianos hace que, a priori, aparezca como una herramienta interesante en este último campo. La aplicación de esta técnica en los estudios de tipado se basa en el uso de un algoritmo que determina la relación existente entre determinaciones individuales de cada aislado. Los distintos espectros se representan en forma de dendograma donde la distancia entre los distintos brazos está directamente relacionada con la similitud entre los espectros y, por tanto, la similitud entre los aislados. Esta aplicación está en fase de desarrollo y el número de estudios al respecto sigue aumentando.

Otro método de tipificación molecular muy utilizado en los brotes es la rep-PCR. Esta técnica utiliza cebadores que hibri-

dan con secuencias específicas de ADN repetitivas (secuencias rep), de función desconocida, que se encuentran dispersas por el genoma de muchas bacterias. Existen 3 tipos de familias de secuencias rep: las secuencias repetitivas palindrómicas extragenómicas (secuencias REP), las secuencias consenso repetitivas intragenómicas de enterobacterias (secuencias ERIC), y las secuencias o elementos BOX. Las secuencias REP son las más utilizadas [5].

En este estudio se ha analizado la utilidad del MALDI-TOF MS y de la rep-PCR para el tipado de *A. baumannii* utilizando como técnica de referencia el PFGE.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se incluyeron en el estudio 21 aislados de *A. baumannii* de la colección del Hospital Clínico San Carlos (HCSC) con distintas características epidemiológicas (tabla 1) y todas ellas portadoras de diferentes carbapenemasas (tabla 2).

Tabla 1	Características epidemiológicas de los aislados.			
	Edad	Sexo	Servicio	Tipo de muestra
A115	40	H	UCI	BAS
A127	64	H	MIN	ESP
A130	60	H	UCI	BAS
A59	73	H	ONC	ESP
A75	81	H	COT	LCOR
A112	78	H	HEM	ESP
A116	51	H	HEM	OR
A19	83	M	END	E
A35	80	M	COT	HQ
A44	87	M	COT	LCOR
A74	55	H	MIN	F
A6	41	H	UCI	BAS
A43	81	H	HEM	ESP
A45	71	H	UCI	BAS
A80	87	H	CG	BAS
A33	64	H	UCI	LBA
A62	61	H	MIN	BAS
A101	79	M	UCI	BAS
A126	84	H	GER	HC
A129	84	H	GER	OR
A11	40	M	COT	HQ

Unidad de cuidados intensivos (UCI), Medicina interna (MIN), Oncología (ONC), Cirugía ortopédica y traumatología (COT), Hematología (HEM), Endocrino (END), Cirugía general (CG), Geriátrica (GER):Broncoaspirado (BAS), Espudo (ESP), Líquido corporal (LCOR), Orina (OR), Escara (E), Herida quirúrgica (HQ), Fístula (F), Lavado broncoalveolar (LBA), Hemocultivo (HC).

Cepa	CMI a imipenem (mg/L)	CMI a meropenem (mg/L)	Enzima
A115	32	8	OXA-201+ISAba1
A127	64	8	OXA-201+ISAba1
A130	32	8	OXA-201+ISAba1
A59	512	128	OXA-65+ISAba1
A75	512	125	OXA-65+ISAba1
A112	256	256	OXA-65+ISAba1
A116	256	256	OXA-65+ISAba1
A19	1	0,25	OXA-65+ISAba1
A35	1	1	OXA-65+ISAba1
A44	1	1	OXA-65+ISAba1
A74	2	2	OXA-65+ISAba1
A6	32	8	OXA-71, OXA-58
A43	32	8	OXA-71, OXA-58
A45	64	4	OXA-71, OXA-58
A80	32	4	OXA-71, OXA-58,
A33	512	256	OXA-66, OXA-24, OXA58
A62	512	256	OXA-64/132, OXA-24
A101	256	256	OXA-64, OXA-24
A126	256	512	OXA-66, OXA-24
A129	64	8	OXA-66, OXA-24
A11	1	0,25	OXA-180

Los aislados se caracterizaron inicialmente mediante PFGE. Se prepararon bloques de agarosa que incluían el ADN bacteriano sin fragmentar. Para ello se partió de una suspensión bacteriana de 10^9 UFC/ml en tampón de resuspensión (Tris 100 mM, EDTA 100mM pH 8.0) que se mezcló con un volumen de agarosa *low melting* al 2% (Low Melt Agrose. BioRad. Catalog 161-3112) en 1% SDS en TE (Tris 10mM EDTA, 1mM pH 7.5) en proporción 1:1. Posteriormente se incubó a 55°C en tampón de lisis (Tris50 mM, EDTA 50 mM pH 8, 1% sarcosil) con proteinasa K (0,1 mg/ml) durante 16 horas con agitación. A continuación, se realizaron 5 lavados de 30 minutos con TE y finalmente se incubó 30 minutos a 25°C en tampón con BSA (100 µg/ml). Transcurrido este tiempo se incorporó la enzima ApaI 15-(20 U de enz/100µl de buffer) durante 16 horas a 25°C. Finalmente, se cargaron los bloques en un gel de agarosa megabase al 1% (BioRad Laboratories, Hercules, CA) 161-3110 en TBE 0, 5X y se realizó la electroforesis en un CHEF-DR III (BioRad Laboratories, Hercules, CA) bajo las siguientes condiciones.

El proceso se llevó a cabo en un CHEF-DR III (BioRad Laboratories, Hercules, CA) siguiendo las siguientes condiciones [6, 7]:

- 21 horas
- Pulsos de 5 a 35 segundos en rampa lineal
- Voltaje 6V/cm o 200V

La visualización de los geles se realizó bajo luz ultravioleta y el análisis informático de los perfiles clonales se realizó con el programa FPQuest (BioRad Laboratories, Hercules, CA) utilizando el índice de correlación de Dice. Los resultados se interpretaron según los criterios descritos por Seifert *et al.* [6], todos los aislados cuya similitud en el patrón de bandas fue mayor o igual al 87% se consideraron el mismo clon.

Para el análisis por MALDI-TOF MS se extrajeron las proteínas de cada aislado con etanol-ácido fórmico siguiendo los protocolos de Bruker, y por cada uno se obtuvieron 24 espectros independientes de manera automática. Se calibraron externamente utilizando BTS y posteriormente se analizaron con el software FlexAnalysis v3,3 (Bruker Daltonics). El programa MALDI Biotyper3 (Bruker Daltonics), se utilizó para generar el dendograma utilizando la configuración predeterminada del programa el cual asigna mediante un algoritmo propio los diferentes grupos o cluster en función de niveles de distancia

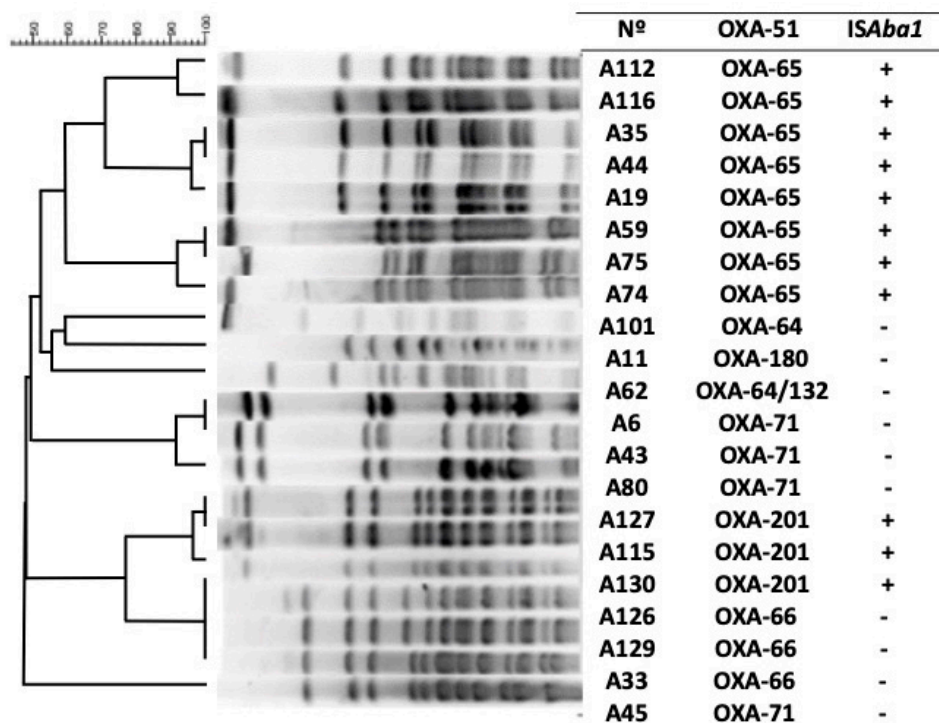


Figura 1 Dendrograma obtenido mediante PFGE con 21 cepas de *A. baumannii*.

arbitraria de los espectros. No se han utilizado puntos de corte porque el programa ya hace sus propios ajustes.

El análisis mediante rep-PCR se realizó a partir de DNA extraído de los diferentes aislados. La extracción se llevó a cabo en un extractor automático NucliSENSeasyMAG (BioMérieux, Marcy L'Etoile, Francia) utilizando como volumen de partida 500 μ l de una suspensión bacteriana en suero salino, ajustada a turbidez 3 en la escala de McFarland y el volumen de elución fue 25 μ l. Tras la extracción de los ácidos nucleicos se determinó la concentración y pureza del DNA en un Nanodrop a 260 nm (Nanodrop Technologies, Wilmington, Delaware, USA). El DNA extraído se amplificó mediante rep-PCR utilizando el kit DiversiLab (BioMérieux, Ginebra, Suiza) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Para el análisis de los productos de PCR, se utilizó un bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies) en el que los fragmentos amplificados se separaron electroforéticamente y detectados mediante el uso de un Labchip con microfluidos.

Los resultados se analizaron utilizando el Software DiversiLab (versión 3.4) que utiliza el índice de correlación de Pearson para calcular similitudes entre las muestras analizadas. Para la interpretación de los resultados obtenidos se llevó a cabo la construcción de dendrogramas y el análisis de los diferentes grupos obtenidos.

RESULTADOS

El análisis cluster es una técnica estadística multivariante que busca agrupar tratando de lograr la máxima homogeneidad dentro de cada grupo y la mayor diferencia entre los grupos.

El análisis mediante PFGE dio como resultado 9 grupos clonales (Figura 1). Los aislados fueron recogidos de diferentes servicios del hospital. Dentro del mismo grupo, todos los aislados que lo forman tienen la misma enzima OXA-51.

El dendrograma MALDI-TOF MS (figura 2A) que se obtiene con el programa de análisis incluido en el sistema, permite diferenciar 2 grupos principales que se identifican con colores diferentes (azul y rojo en este caso) y en los que estarían incluidos 20 de los 21 aislados del estudio; un aislado (A80) quedaría sin agrupar, presentándose como perfil único. Dentro de los dos cluster principales se pueden observar agrupaciones con una elevada homología, cercana al 100%, como A115, A44, A62, A33 y A59, o A11 y A130. A129 muestra una similitud cercana al 95% con los aislados del grupo mencionado (A115, A44...) mientras que A74 lo muestra con los aislados de la segunda agrupación (A11 y A130). El resto de aislados del estudio presenta una menor homología.

En el dendrograma obtenido mediante rep-PCR (figura 2B), se obtuvieron 7 grupos clonales utilizando el mismo punto de

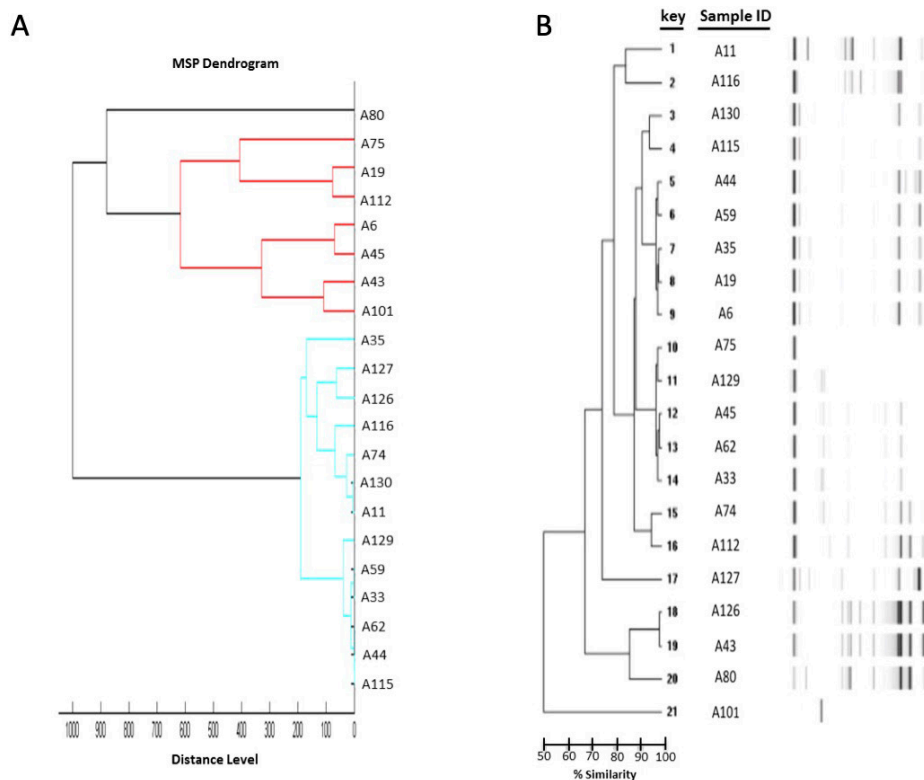


Figura 2 Dendogramas obtenidos con los 21 aislados del estudio mediante rep-PCR (1A) y realizado con Maldi Biotyper 3 (1B).

corte que en PFGE (87%). Si se utilizan puntos de corte similares a los de otros autores [8], el número se eleva hasta los 11 grupos.

La comparación inicial de los resultados del análisis llevado a cabo con las tres técnicas revela muy poca correlación entre sí, si bien, se puede observar como los aislados A129, A62 y A33 aparecen dentro del mismo cluster en las tres técnicas probadas. Los otros aislados que por PFGE aparecen dentro del mismo grupo (A126 y A101) quedan muy alejados (tienen poca homología) por rep-PCR mientras que por MALDI-TOF MS uno de ellos (A126) sí aparecería dentro del mismo grupo pero no así el A101.

Comparando rep-PCR y PFGE se puede ver que los aislados A130 y A115, al igual que A19, A35 y A44, aparecen en las mismas agrupaciones por ambas técnicas.

La comparación de MALDI-TOF MS y rep-PCR, además de los puntos ya señalados, muestran el aislado A80 como un perfil único.

DISCUSIÓN

A. baumannii es un microorganismo frecuentemente implicado en infección nosocomial. Es un patógeno ubicuo y, en

el ambiente hospitalario, se ha aislado en todo tipo de superficies además de colonizando la piel de pacientes y personal sanitario. Su resistencia a la desecación y la evasión de la inmunidad del huésped facilitan su supervivencia y transmisión [9].

En nuestro hospital se han identificado diferentes clones que principalmente colonizan unidades de cuidados intensivos, lo que supone un problema ya que son éstas las zonas donde se encuentran los pacientes más susceptibles.

Actualmente la identificación de estos clones requiere técnicas como el PFGE, que es considerado el método "gold standard" para la tipificación bacteriana, pero supone un proceso largo, un coste elevado y precisa personal entrenado para realizarlo [4]. De este modo, estas técnicas no son una opción asequible para la mayoría de laboratorios.

Un sistema de tipificación ideal debe ser fácil, rápido, con un poder discriminatorio elevado, alta reproducibilidad, bajo coste y con resultados comparables entre diferentes hospitales [8].

MALDI-TOF MS y rep-PCR son, a priori, dos técnicas que reúnen estas condiciones y que, por tanto, podrían ser de gran utilidad para el control y manejo de brotes si se comprueba que presentan una capacidad discriminatoria adecuada. Por este motivo, el objetivo de este trabajo ha sido evaluar ambas

técnicas con 21 aislados clínicos utilizando como referencia los grupos obtenidos con la electroforesis en campo pulsado.

Los trabajos publicados hasta la fecha no son concluyentes con ninguna de las dos técnicas. En el caso de MALDI-TOF MS la literatura actual muestra tanto resultados positivos para la tipificación de varias especies (*Salmonella*, *Listeria*...) [10] como fracasos en la obtención de una resolución satisfactoria. Los estudios fallidos muestran una mayor heterogeneidad en comparación con el genotipado [4, 10]. En este estudio, los datos del MALDI-TOF MS estarían en concordancia con los estudios menos favorables ya que el número de perfiles obtenidos es menor que el que muestra la electroforesis en campo pulsado. Además, los grupos obtenidos por ambos métodos son dispares.

Sucede algo similar al analizar los datos de rep-PCR. Las publicaciones sobre el uso de rep-PCR como herramienta para el estudio de perfiles genéticos en comparación con PFGE indican poca correlación entre ambas técnicas [8]. Sin embargo cuando se emplean programas específicos de análisis de datos como BioNumerics la concordancia con la electroforesis en campo pulsado aumenta de manera significativa [11]. Cuando el agrupamiento de aislados se realiza en función de genes de resistencia a carbapenémicos los datos que se obtienen también son prometedores [12, 13]. En nuestro caso, no se ha obtenido buena correlación, si bien es cierto que no se han utilizado programas específicos de análisis de datos.

En general, los datos previos obtenidos por otros autores [14] con MALDI-TOF MS y *A. baumannii* son concordantes con lo obtenido en este trabajo. Aunque inicialmente [15] los resultados eran prometedores, estudios posteriores [14] indican la falta de sensibilidad para la distinción de grupos clonales de *A. baumannii* y la necesidad de estandarización del método en distintos laboratorios.

En este estudio no se encontró correlación entre MALDI-TOF MS y PFGE. Los resultados rep-PCR y PFGE tampoco fueron concordantes ni la comparación entre MALDI-TOF MS y rep-PCR.

Una posible causa para la escasa correlación encontrada entre los resultados de MALDI-TOF MS y PFGE podría ser que cada método mide propiedades celulares completamente diferentes [4]. Esto sin embargo no puede aplicarse a la falta de concordancia entre PFGE y rep-PCR ya que en ambas técnicas se miden características del material genético, si bien cada una de ellas tiene dianas diferentes (PFGE genoma completo del microorganismo; rep-PCR secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas).

Parece claro que la estandarización de los métodos es fundamental para la obtención de resultados repetitivos y fiables. Varios estudios muestran la importancia de realizar un control riguroso en el tipo y la concentración de la matriz, el procedimiento de preparación de la muestra, la mezcla de matriz y solvente, la concentración de ácido agregado a la matriz y el medio de crecimiento. Se ha visto que todos estos parámetros influyeron en el perfil espectral [10]. Todos estos factores se tuvieron en cuenta a la hora de llevar a cabo estos ensayos, por

lo que presuntamente, no deberían haber influido en los datos obtenidos.

El conjunto de los resultados parece indicar que, aunque tanto el MALDI-TOF MS como la rep-PCR son herramientas sencillas y atractivas para el análisis de tipificación molecular, se requieren más estudios para poder estandarizar condiciones y establecer protocolos de interpretación que permitan su inclusión de manera fiable en los laboratorios de microbiología.

FINANCIACIÓN

Los autores declaran no haber recibido financiación para la realización de este estudio.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

1. Motbainor H, Bereded F, Mulu W. Multi-drug resistance of blood stream, urinary tract and surgical site nosocomial infections of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* among patients hospitalized at Felegehiwot referral hospital, Northwest Ethiopia: a cross-sectional study. *BMC infectious diseases* 2020; 20(1): 92. doi:10.1186/s12879-020-4811-8
2. Ahmed Khan H, Kanwal Baig F, Mehboob R. Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance. *Asian Pac J Trop Biomed* 2017; 7(5): 478-482
3. WHO [Online]: <https://www.who.int/es/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
4. Spinali S, Van Belkum A, V. Goering R, Girard V, Welker M, Van Nuenen M, et al. Microbial Typing by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization- Time of Flight Mass Spectrometry: Do We Need Guidance for Data Interpretation? *J Clin Microbiol.* 2015; 53(3): 760-765.
5. Fernández Cuenca F, López Cerero L, Pascual Hernández A. Molecular typing methods for infection monitoring and control. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013; 31(Sup1): 20-5. doi: 10.1016/S0213-005X(13)70110-1.
6. Seifert H, Dolzani L, Bressan R, Tanny van der Reijden, Beppie van Strijen, Danuta Stefanik et al. Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(9): 4328-4335. doi: 10.1128/JCM.43.9.4328-4335.2005.
7. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, P A Mickelsen, B E Murray, D H Persing et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995; 33(9): 2233-2239.
8. Babouee B, Frei R, Schultheiss E, Widmer A. F, y Goldenberger D. Comparison of the DiversiLab Repetitive Element PCR System with spa Typing and Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Clonal

- Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2011; 49(4): 1549–1555. doi: 10.1128/JCM.02254-10.
9. Wong D, Nielsen T, Bonomo R, Pantapalangkoor P, Luna B, Spellberg B. Clinical and Pathophysiological Overview of *Acinetobacter* Infections: a Century of Challenges. *Clin Microbiol Rev.* 2017; 30(1): 409-447. doi: 10.1128/CMR.00058-16.
 10. Murray P. R. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: usefulness for taxonomy and epidemiology. *Clin Microbiol Infect.* 2010; 16(11): 1626-30. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03364.x.
 11. Healy M, Huong J, Bittner T, Lising M, Frye S, Raza S, et al. Microbial DNA Typing by Automated Repetitive-Sequence-Based PCR. *J Clin Microbiol* 2005; 43(1): 199-207. doi: 10.1128/JCM.43.1.199-207.2005.
 12. Pasanen T, Kostela S, Mero S, Tarkka E, Tissari P, Vaara M, et al. Rapid Molecular Characterization of *Acinetobacter baumannii* Clones with rep- PCR and Evaluation of Carbapenemase Genes by New Multiplex PCR in Hospital District of Helsinki and Uusimaa. *PLoS One.* 2014; 9(1): e85854
 13. Zhong-Qiang Y, Ding-Xia S, Jing-Rong C, Rong C, Xing W, Li-Ping L, et al. Susceptibility patterns and molecular epidemiology of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains from three military hospitals in China *International Journal of Antimicrobial Agents*, ISSN: 0924-8579, Vol: 35, Issue: 3, Page: 269-273
 14. Mencacci A, Monari C, Leli C, Merlini L, De Carolis E, Vella A, et al. Typing of nosocomial outbreaks of *Acinetobacter baumannii* by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2013; 51: 603-6.
 15. Sousa C, Botelho J, Grosso F, Silva L, Lopes J, Peixe L. Unsuitability of MALDI-TOF MS to discriminate *Acinetobacter baumannii* clones under routine experimental conditions. *Front Microbiol.* 2015; 6: 481