

Hastane Enfeksiyonu Etkeni Olan *Acinetobacter baumannii* İzolatları Arasındaki Klonal İlişkinin Rep-PCR ile Araştırılması*

Investigation of The Clonal Relationship Between Nosocomial *Acinetobacter baumannii* Isolates by Rep-PCR

Harun GÜLBUDAK¹, Gönül ASLAN¹, Seda TEZCAN¹, Gülden ERSÖZ², Mahmut ÜLGER¹, Feza OTAĞ¹, Necdet KUYUCU³, Gürol EMEKDAŞ¹

¹ Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

¹ Mersin University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Mersin, Turkey.

² Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

² Mersin University Faculty of Medicine, Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Mersin, Turkey.

³ Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Mersin.

³ Mersin University Faculty of Medicine, Department of Pediatric Infectious Diseases, Mersin, Turkey.

* Bu çalışma, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından "BAP-SBE TM (HG) 2011-5 YL" no'lu proje ile desteklenmiştir.

Geliş Tarihi (Received): 27.11.2013 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 11.02.2014

ÖZET

Acinetobacter türleri hastane kaynaklı enfeksiyonlara neden olan fırsatçı patojenlerdir ve çoklu ilaç direncine sahip *Acinetobacter* türlerinin hastane ortamında yayılması enfeksiyon kontrolü açısından önemli bir problemdir. Bu çalışmada, hastane kaynaklı *A.baumannii* izolatlarının klonal yakınlıklarının, rep-PCR yöntemiyle belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, Ekim 2011-Mayıs 2012 tarihleri arasında, hastanede yatan hastaların klinik örneklerinden izole edilen toplam 75 *Acinetobacter* izolatı dahil edilmiştir. *Acinetobacter* izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları, CLSI önerileri doğrultusunda, Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle test edilmiştir. Piperasilin, piperasilin-tazobaktam, sefepim, seftazidim, imipenem, meropenem, gentamisin, amikasin, tetrasiklin, levofloksasin, siprofloksasin ve trimetropim-sülfametoksazole direnç oranları sırasıyla; %96, %96, %97.3, %89.3, %96, %94.6, %66.7, %85.3, %68, %82.7, %97.3, %89.3 olarak belirlenmiştir. Çalışmadaki izolatların 73 (%97)'ünde üç veya daha fazla grup antibiyotiğe direnç (çoklu ilaç direnci) saptanmıştır. Rep-PCR ile yapılan klonal ilişki analizinde iki ana klon [A (7 alt tip), B (3 alt tip)] olmak üzere toplam sekiz (A-H) farklı klon tespit edilmiş; A klonunun baskın tip olduğu belirlenmiştir. Yetmiş beş *Acinetobacter* izolatının %72 (n= 54)'sinin A klonuna ait olduğu tespit edilmiş; B klonuna ait 13 izolat, C ve D klonlarında ikiye izolat, diğer klonlarda

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Gönül Aslan, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Çiftlikköy Kampüsü, Yenişehir 33343, Mersin, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 324 361 0684-1001, **E-posta (E-mail):** drgaslan@gmail.com

(E, F, G, H) ise birer izolat saptanmıştır. A klonu, reanimasyon yoğun bakım ünitesi örneklerinin %71 (20/28)'inden, cerrahi servislerinden gönderilen örneklerin %70 (7/10)'inden ve dahiliye yoğun bakım ünitesi örneklerinin tamamından (6/6) izole edilmiştir. İlk ve son izolatin izolasyon tarihleri arasında sekiz aylık süre olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, bu çalışmada hastanemize ait *Acinetobacter* izolatlarının direnç oranlarında artış izlenmiş ve bu artışın aynı klonla ait izolatların yayılımı ile paralel olduğu ortaya konmuştur. A klonuna ait izolatların, hastanemiz yoğun bakım ünitelerinde ve diğer servislerde hakim olduğu görülmüştür. *Acinetobacter* izolatlarının servisler arası transfer edilen hastalar ve çapraz bulaşlar sonucu yayıldığı düşünülmüştür. Çalışmada kullanılan rep-PCR yönteminin epidemiyolojik çalışmalarda ve enfeksiyon kontrolünde kullanılabilecek kolay uygulanabilen, hızlı ve başarılı bir yöntem olduğu kanısına varılmıştır. Dirençli izolatların hastane ortamındaki dağılımının klonal ilişki göstermesi, enfeksiyon kontrol önlemlerinin önemini bir kez daha vurgulamaktadır.

Anahtar sözcükler: *Acinetobacter baumannii*; antimikrobiyal direnç; klonal ilişki; rep-PCR.

ABSTRACT

Acinetobacter spp. are opportunistic bacterial pathogens primarily associated with hospital-acquired infections and the spread of multidrug resistant *Acinetobacter* strains is a growing problem in terms of infection control. The aim of this study was to determine the clonal relationship between strains of nosocomial *Acinetobacter baumannii* by using rep-PCR method. A total of 75 *Acinetobacter* strains isolated from various clinical samples of the hospitalized patients between October 2011-May 2012 were included in the study. Antibiotic susceptibilities of *Acinetobacter* isolates were investigated by Kirby-Bauer disk diffusion method according to CLSI guidelines. According to disk diffusion test, the resistance rates for piperacillin, piperacillin-tazobactam, cefepime, ceftazidime, imipenem, meropenem, gentamicin, amikacin, tetracycline, levofloxacin, ciprofloxacin and trimetoprim-sulfamethoxazole were 96%, 96%, 97.3%, 89.3%, 96%, 94.6%, 66.7%, 85.3%, 68%, 82.7%, 97.3% and 89.3% respectively. In this study, 73 (97%) strains were found resistant to three or more than three antibiotics (multidrug resistant). Rep-PCR analysis have shown the presence of eight clones, including two major clones [A (7subtypes), B (3 subtypes)] and six unique clones (C-H). Clone A was found to be the dominant type. Fifty-four (72%) of the 75 *Acinetobacter* strains belonged to clone A, 13 (17.3%) to clone B, two strains to clone C, D, and one of each to the other clones (E, F, G, H). Clone A was isolated from 71% (20/28), 70% (7/10) and 100% (6/6) of the samples sent from reanimation intensive care unit, surgery ward and internal diseases intensive care units, respectively. The time interval between the first and last strain was eight months. The results of this study indicated an increase in the resistance rates of *Acinetobacter* strains in our hospital and this increase was attributed to the clonal dissemination of the strains. Strains of the clone A were found to be dominant at the intensive care and other clinics of our hospital. It is contemplated that *Acinetobacter* strains were scattered as a result of cross transmission and patient transfer among clinics. The rep-PCR method which was used in this study was evaluated as a rapid, easily applicable and successful procedure for epidemiological studies. Clonal distribution of resistant strains in the hospital environment emphasizes the significance of infection control measures.

Key words: *Acinetobacter baumannii*; antimicrobial resistance; clonally relationship; rep-PCR.

GİRİŞ

Acinetobacter türleri, 1970'li yıllarda cerrahi servislerde idrar yolu enfeksiyonlarına neden olurken, günümüzde yoğun bakım üniteleri (YBÜ)'nde yayılarak nozokomiyal enfeksiyonlara neden olan önemli bir problem haline gelmiştir¹. Hastane enfeksiyonlarına neden olan *A.baumannii* kompleks grubu içerisinde yer alan *A.pitti*, *A.nosocomialis* ve *A.baumannii* türleri arasında en sık hastane enfeksiyonları ile anılan tür *A.baumannii*'dir².

A.baumannii cilt florasında nadir olarak bulunan bir türdür, ancak hastane ortamında bir kez izole edilmesi, YBÜ'deki hastalar için önemli bir risk oluşturmaktadır^{3,4}. Bu gruptaki hastaların immün sistemlerinin baskılanmış olması, uzun süre hastanede kalmaları, mekanik ventilasyon, kateter kullanımı ve geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi *A.baumannii* enfeksiyon riskini artırmaktadır⁵. *Acinetobacter* türlerinin çevresel şartlara dayanıklı olması ve mevcut antibiyotik sınıflarına karşı direnç mekanizmalarının bulunması ya da yeni direnç özellikleri kazanabilmeleri, bu organizmayı başarılı bir nozokomiyal patojen haline getirmektedir⁶. Hastanelerde ortaya çıkan çok ilaca dirençli (ÇİD) *Acinetobacter* suşları kontrol edilmediği takdirde hastane içerisinde salgınlara neden olabilmektedir; ayrıca dirençli suşların neden olduğu salgınlara hastaneler arasında yayılarak şehirlerarası ya da ülkelerarası genişlikte salgınlara neden olma potansiyeline sahiptir⁶⁻⁸.

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarının bir parçası haline gelen moleküler tiplendirme amacıyla PFGE (Pulsed-field gel electrophoresis), RFLP (Restriction fragment length polymorphism), RAPD (Random amplified polymorphic DNA) ve tekrarlayan dizi temelli polimeraz zincir reaksiyonu (Repetitive sequence-based PCR; rep-PCR) gibi yöntemler kullanılmaktadır⁹. Son yıllarda rep-PCR yönteminin, hızlı ve kolay uygulanabilirliği ile dikkat çeken DiversiLab® sistemi (bioMeriëux, Fransa) ile sunulması, yarı otomatize şekilde moleküler tiplendirme olanağı sağlamıştır. Bu yöntemin altın standart kabul edilen PFGE ve f-AFLP (fluorescent amplified fragment-length polymorphism) tiplendirme yöntemleri ile karşılaştırılabilir sonuç verdiği gösterilmiştir^{9,10}. Bu çalışmada, hastane enfeksiyonu etkeni olarak çeşitli klinik örneklerden izole edilen *A.baumannii* kompleks izolatlarının rep-PCR yöntemi ile klonal ilişkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bakteri İzolatları ve Antibiyotik Duyarlılık Testi

Çalışmaya, Ekim 2011-Mayıs 2012 tarihleri arasında, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında çeşitli klinik örneklerden izole edilen 75 *A.baumannii* kompleks izolatı dahil edildi. Tür tayini Gram boyama, oksidaz testi ve Vitek 2 (bioMeriëux, Fransa) otomatize sistemi ile yapıldı. İzolatlar çalışma için %10 gliserollü buyyona alınarak -30°C'de saklandı. Birden fazla örneğinde *A.baumannii* kompleks izole edilen hastaların sadece bir örneği çalışmaya alındı. Bakterilerin izole edildiği hastalar ile ilgili bilgiler ve hasta hareketleri hastane bilgi sisteminden araştırıldı.

A.baumannii kompleks izolatlarının antibiyotik duyarlılık testi, Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile CLSI standartları doğrultusunda yapıldı¹¹. Ticari olarak temin edilen (Oxoid, İngiltere) piperasilin (100 µg), piperasilin-tazobaktam (100/10 µg), sefepim (30 µg), seftazidim (30 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), gentamisin (10 µg), amikasin (30 µg), tetrasiklin (30 µg), levofloksasin (5 µg), siprofloksasin (5 µg) ve trimetoprim-sülfametoksazol (TMP-SMX) (1.25/23.75 µg) diskleri kullanıldı.

Klonal İlişkinin Belirlenmesi

A.baumannii izolatlarının klonal ilişkisinin belirlenmesinde rep-PCR DiversiLab sistemi (bioMeriëux, Fransa) kullanıldı. DNA ekstraksiyonu, "UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit" (MoBio Laboratories, ABD) ile, kanlı ağara pasajlanan bir günlük izolatlardan 1 µl öze dolusu alınarak üretici firma önerileri doğrultusunda yapıldı. DNA mik-

tarları nanodrop cihazı ile ölçülerek 35 ng/µl olacak şekilde seyreltildi. Bakteri DNA'ları *Acinetobacter* DNA parmak izi kit "DiversiLab™ DNA Fingerprinting Kit" (bioMérieux, Fransa) kullanılarak amplifiye edildi. Termal döngü parametreleri; başlangıç denatürasyonu 94°C'de 2 dakika; 35 döngüdeki denatürasyon 94°C'de 30 saniye, primer bağlanması 50°C'de 30 saniye, zincir uzaması 70°C'de 90 saniye; son uzama 70°C'de 3 dakika şeklinde uygulandı. Elektroforez işlemi için "Diversilab™ DNA LabChip Kit"i (bioMérieux, Fransa) ile Agilent 2100 bioanalizer (Agilent Technologies Inc, ABD) cihazında mikroakışkan elektroforez yapıldı.

Rep-PCR parmak izi sonuçları internet tabanlı DiversiLab analiz programı (bioMérieux, Fransa) ile elde edildi. Örneklerin benzerliklerinin belirlenmesi ve dendrogram oluşturmak için Pearson korelasyon katsayısı ve UPGMA yöntemi kullanıldı. Sonuçların değerlendirilmesinde %95'in üzerinde benzerlik gösteren izolatlar ana klon; ana klon içerisinde %97'nin üzerinde benzerlik gösteren izolatlar alt tip (ayrıt edilemez) olarak kabul edildi. Benzerlik oranları %95'in altında (> 2 bant farkı) olan izolatlar farklı klon olarak değerlendirildi.

BULGULAR

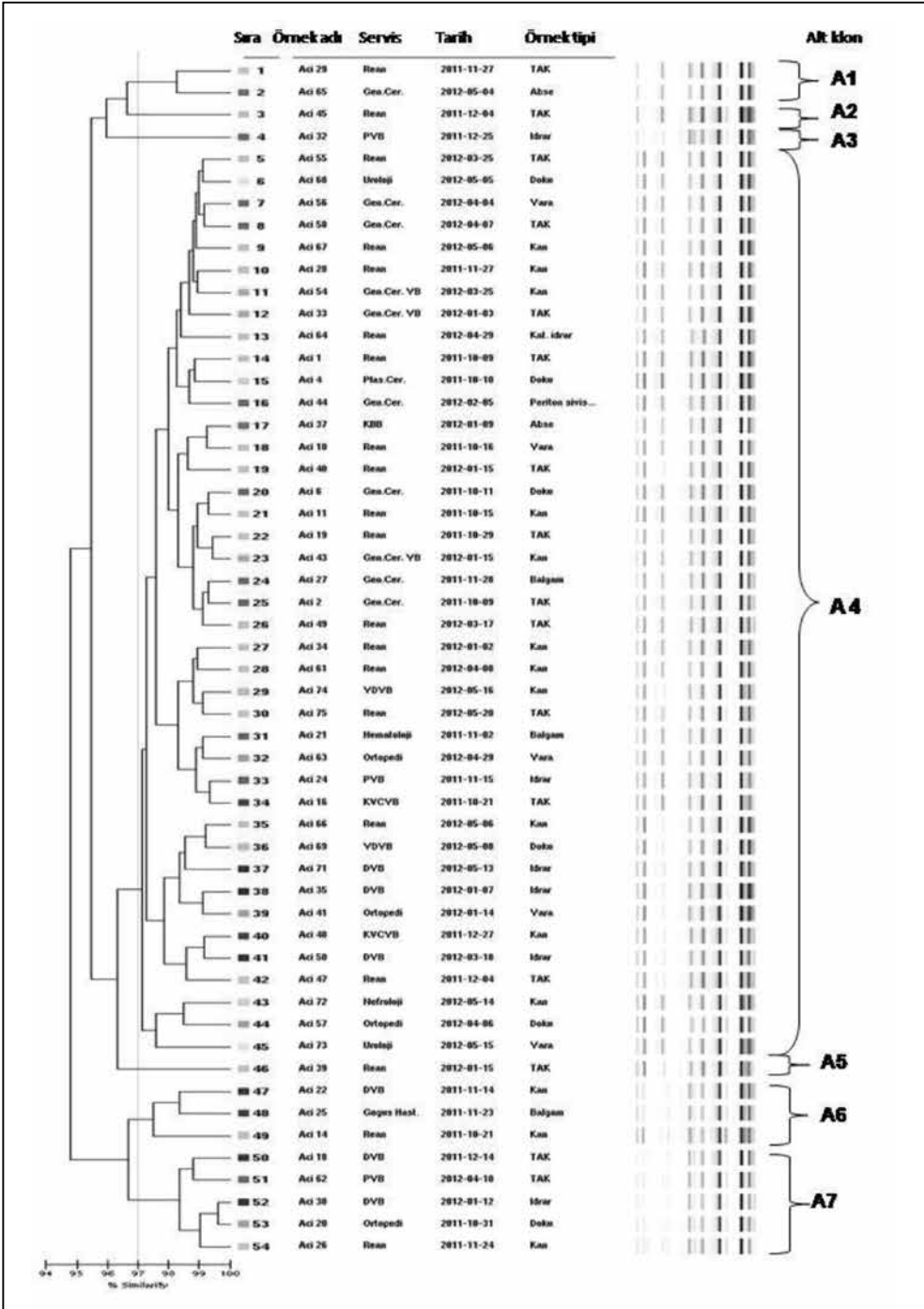
Çalışmaya alınan 75 *A.baumannii* kompleks izolatının 23 (%30.6)'ü trakeal aspirat, 18 (%24)'i kan, 8 (%10.6)'i doku, 7 (%9.4)'si idrar, 7 (%9.4)'si yara, 3 (%4)'ü balgam ve 9 (%12)'u diğer (apse, kateter, dren, BOS, kateter idrar, periton sıvısı) klinik örneklerden izole edilmiştir. *A.baumannii* kompleks izolatlarının 50 (%67)'si YBÜ'den (Anestezi-Reanimasyon: 28, Yenidoğan: 6, Dahiliye: 6, Cerrahi: 4, Pediatri: 3, Kalp-Damar Cerrahi: 3); 25 (%33)'i ise diğer servislerden (Genel Cerrahi: 10, Ortopedi: 5, Plastik Cerrahi: 2, Hematoloji: 2, Üroloji: 2, Nefroloji: 2, KBB: 1, Göğüs Hastalıkları: 1) gönderilen hasta örneklerinden izole edilmiştir.

İzolatların tür ayrımı için ileri bir moleküler yöntem kullanılmamış; ancak rep-PCR profilleri DiversiLab kütüphanesi ile karşılaştırıldığında 74'ü *A.baumannii*, biri ise *A.pitti* olarak tanımlanmıştır.

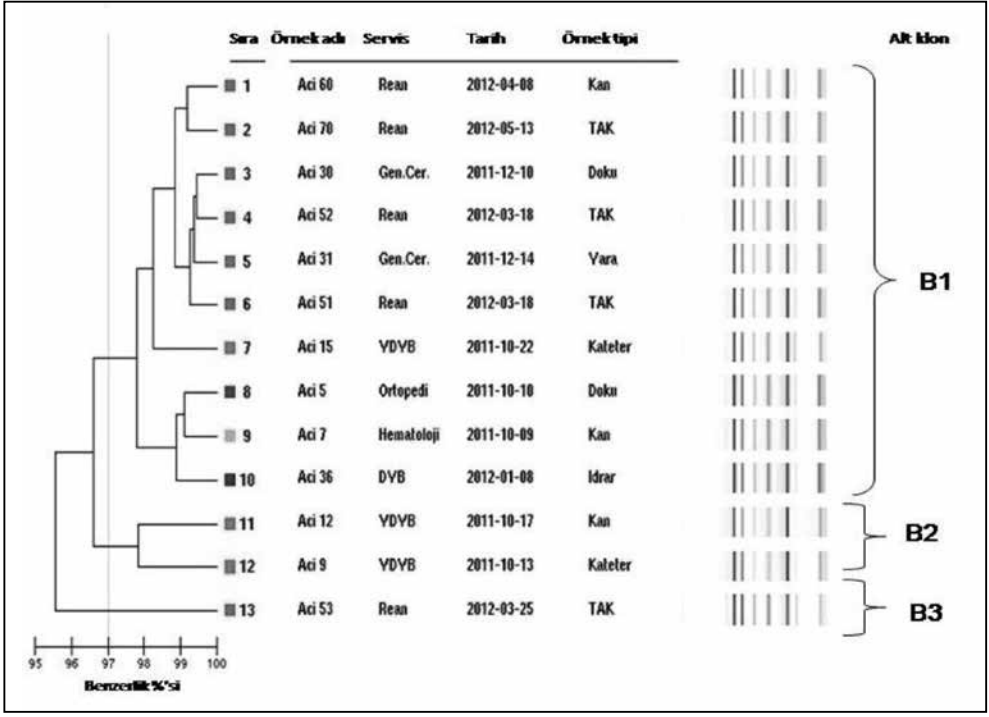
Çalışmaya dahil edilen izolatlar, hastaların hastaneye yatışından ortalama 13.7 gün sonra izole edilmiştir. Hastaların 5'inde hastaneye yattığı ilk gün alınan klinik örneklerde izolasyon gerçekleştirilmiştir.

Disk difüzyon testi (DDT) sonuçlarına göre, çalışmadaki 75 izolatın 73'ü ÇİD suşlar olup, *A.pitti* olarak tanımlanan suşun duyarlı olduğu izlenmiştir. İzolatların DDT sonuçları piperasilin, piperasilin-tazobaktam, sefepim, seftazidim, imipenem, meropenem, gentamisin, amikasin, tetrasiklin, levofloksasin, siprofloksasin ve TMP-SMZ direnç oranları sırasıyla; %96, %96, %97.3, %89.3, %96, %94.6, %66.7, %85.3, %68, %82.7, %97.3 ve %89.3 olarak belirlenmiştir.

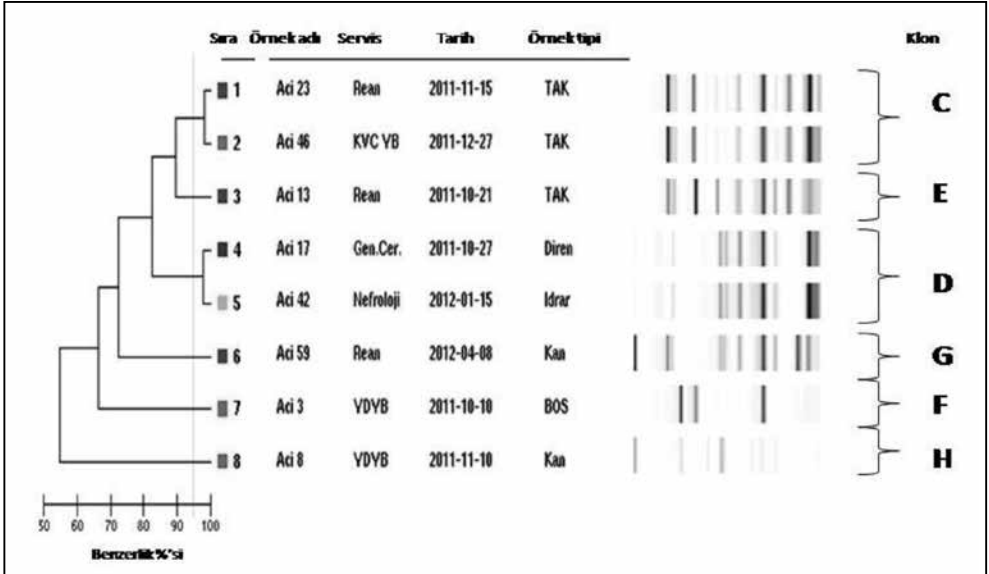
Çalışmada rep-PCR DiversiLab yöntemi ile tiplendirilen 75 *Acinetobacter* izolatından 2'si ana klon (A ve B) olmak üzere toplam 8 farklı klon (A-H) tespit edilmiştir. A ana klonunun, 54 (%72) izolatın toplandığı en büyük kümeyi oluşturduğu ve 7 alt tipe (A1-A7) ayrıldığı saptanmıştır. A klonundaki alt tipler A1 (n= 2), A2 (n= 1), A3 (n= 1), A4 (n= 41), A5 (n= 1), A6 (n= 3) ve A7 (n= 5) olarak kümelendirilmiştir (Şekil 1). İkinci büyük klon ise 13 (%17.3) izolat içeren B ana klonu olup, bu klona ait alt tipler: B1 (n= 10), B2 (n= 2) ve



Şekil 1. A ana klonuna ait dendrogram.



Şekil 2. B ana klonuna ait dendrogram.



Şekil 3. C, D, E, F, G, H klonlarına ait dendrogram.

B3 (n= 1) şeklindedir (Şekil 2). Diğer klonlar; 2'şer izolat ile C ve D; birer izolat ile de E, F, G ve H olmak üzere, epidemik klonlardan bağımsız kümelenmiştir (Şekil 3).

TARTIŞMA

Nozokomiyal *Acinetobacter* enfeksiyonlarındaki en önemli sorun, mevcut tüm antibiyotiklere dirençli suşların bulunması ve direnç oranlarının artış eğilimi göstermesidir¹²⁻¹⁴. Lokal bölgelerde, duyarlılık testleri sonucu elde edilen ÇİD suşların genotiplendirme yöntemleri ile klon karşılaştırması yapılmaz ise, epidemiyolojik olarak baskın aynı tip ÇİD suşların, direnç seviyesini artırma eğilimi gösterdiği belirtilmektedir¹⁵. Bizim çalışmamızdaki *Acinetobacter* suşlarının %97'si de ÇİD izolatlarından oluşmaktadır.

Antibiyotikleme sonuçları, ÇİD *Acinetobacter* izolatlarının hastane salgınına neden olabileceği uyarısını verse de, suşlar arasındaki farklılıkları ayırt etmede yeterli değildir. Bu yüzden, PFGE ya da PCR tabanlı genotiplendirme yöntemlerinden biri ile nozokomiyal *A.baumannii* epidemileri araştırılmalıdır¹⁶. Fontana ve arkadaşları⁹, 11 aylık dönemde, YBÜ'de yatan hastalardan ve çevre örneklerinden izole ettikleri sırasıyla 56 ve 15 *A.baumannii* izolatını rep-PCR DiversiLab sistemi ile tiplendirmiş ve bunları klonal olarak ilişkili bulmuşlardır. Yapılan çalışmalarda, rep-PCR ile alınan sonuçların f-AFLP yöntemi ile benzer olduğu; rep-PCR'nin ayırt edici gücünün, altın standart kabul edilen PFGE yöntemi ile karşılaştırılabilir düzeyde olduğu belirtilmektedir^{9,10,17}. Sunulan bu çalışmada, rep-PCR yöntemi, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter* izolatları arasındaki klonal ilişkiyi ortaya koymak amacıyla kullanılmıştır. Araştırmamızda, iki ana klon (A ve B) olmak üzere sekiz farklı klon elde edilmiş ve A ana klonunun hastanemizdeki baskın tip (n= 54; %72) olduğu saptanmıştır. Klonal ilişkili izolatlar, solunum yolu örneklerinden izole edilenlerin %73 (19/26)'ünü ve kan kültürü izolatlarının %77 (14/18)'sini içermektedir. Klondaki ilk izolatlar, 09.10.2011 tarihinde reanimasyon ünitesi ve genel cerrahi servisinde yatan iki hastanın trakeal aspirat (TA) örneğinden; klondaki son izolat ise 20.05.2012 tarihinde yine reanimasyon ünitesinde yatan bir hastanın TA kültüründen izole edilmiştir. A klonu, reanimasyon YBÜ örneklerinin %71 (20/28)'inden, cerrahi servis örneklerinin %70 (7/10)'inden ve dahiliye YBÜ örneklerinin (6/6) tamamından izole edilmiştir. Başka bir bakış açısıyla, %97 ve üzeri benzerlik profiline sahip A4-alt klonundaki 41 *Acinetobacter* izolatı, çalışmanın yapıldığı sekiz ay boyunca hastanedeki varlığını sürdürmüştür. Ergin ve arkadaşları¹⁸ rep-PCR yöntemi ile, 2004-2009 yılları arasında kan kültürlerinden izole edilen ÇİD 100 *A.baumannii* izolatında epidemiyolojik ilişki gösteren 13 klon (62 izolat) tespit etmişlerdir. Ana klonları oluşturan izolatların 10'u 1. klonda; dokuzu 2. klonda; dokuzu 3. klonda; yedisi 4. klonda küme oluşturmuştur. Farklı klonlardaki izolatlar 33 ay, 40 ay ve 53 ay gibi uzun süre aralığında izole edilmeye devam etmiştir. Malatya'dan bildirilen bir çalışmada, 131 *Acinetobacter* suşunun PFGE ile %72.3'ünün klonal yönden ilişkili olduğu tespit edilmiş ve suşların 27 aya kadar hastane ortamından izole edildiği belirtilmiştir¹⁹. Çin'den bildirilen bir çalışmada, bir klonun 6 yıl boyunca izole edildiği ve aynı klonun üç farklı şehirdeki hastanelere yayıldığı tespit edilmiştir²⁰. Çalışmamızda ikinci hakim klon olarak belirlenen B klonu 13 (%17.3) izolat içermektedir ve bu klondaki izolatlar da sekiz ay boyunca hastanede varlığını sürdürmüştür. Elde edilen veriler ile,

hastaların servisler arası transferleri, hastalar ve sağlık personeli aracılığıyla gerçekleşen çapraz bulaşlar sonucu izolatların hastane içerisinde kolayca yayıldığı ve uzun süre varlığını sürdürdüğü tekrar ortaya konmuştur.

Çalışmamızın en önemli sınırlamaları, kısa süreyi kapsamaması (8 ay) ve örnek sayısının az (n= 75) olmasıdır. Bu süre içerisinde hastanemize ait *Acinetobacter* izolatlarının direnç oranları izlenmiş ve direnç oranlarındaki artışın aynı klonla ait epidemiyolojik olarak ilişkili izolatların yayılımı ile paralel olduğu ortaya konmuştur. Servisler arasında ya da servis-YBÜ arasında hasta transferlerinin sık olması *Acinetobacter* suşlarının yayılmasını kolaylaştırmıştır. A ve B klonuna ait izolatların özellikle yoğun bakım ünitelerinde sekiz ay boyunca yaygın olmasının temeli budur. Sonuç olarak, dirençli *Acinetobacter* suşlarının hastane ortamındaki dağılımının klonal ilişki göstermesi, enfeksiyon kontrol programlarının önemini bir kez daha vurgulamış ve rep-PCR DiversiLab® sisteminin *Acinetobacter* izolatlarıyla ilgili moleküler epidemiyolojik çalışmalarda başarıyla kullanılabileceği düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Joly-Guillou ML. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. Clin Microbiol Infect 2005; 11(11): 868-73.
2. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Nat Rev Microbiol 2007; 5(12): 939-51.
3. Seifert H, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Pelzer N, Tjernberg I, Vaneechoutte M. Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. J Clin Microbiol 1997; 35(11): 2819-25.
4. Howard A, O'Donoghue M, Feeney A, Sleator RD. *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. Virulence 2012; 3(3): 243-50.
5. García-Garmendia JL, Ortiz-Leyba C, Garnacho-Montero J, et al. Risk factors for *Acinetobacter baumannii* nosocomial bacteremia in critically ill patients: a cohort study. Clin Infect Dis 2001; 33(7): 939-46.
6. Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51(10): 3471-84.
7. Naas T, Coignard B, Carbonne A, et al. VEB-1 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii*, France. Emerg Infect Dis 2006; 12(8): 1214-22.
8. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev 2008; 21(3): 538-82.
9. Fontana C, Favaro M, Minelli S, et al. *Acinetobacter baumannii* in intensive care unit: novel system to study clonal relationship among the isolates. BMC Infect Dis 2008; 8: 79.
10. Saeed S, Fakhri MG, Riederer K, Shah AR, Khatib R. Interinstitutional and intrainstitutional transmission of a strain of *Acinetobacter baumannii* detected by molecular analysis: comparison of pulsed-field gel electrophoresis and repetitive sequence-based polymerase chain reaction. Infect Control Hosp Epidemiol 2006; 27(9): 981-3.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 22nd Informational Supplement. CLSI Document M100-S22, 2012. CLSI, Wayne, PA.
12. Lee K, Yong D, Jeong SH, Chong Y. Multidrug-resistant *Acinetobacter* spp.: increasingly problematic nosocomial pathogens. Yonsei Med J 2011; 52(6): 879-91.

13. Ozdem B, Gürelik FC, Celikbilek N, Balıkçı H, Açıkgöz ZC. Antibiotic resistance profiles of *Acinetobacter* species isolated from several clinical samples between 2007-2010. Mikrobiyol Bul 2011; 45(3): 526-34.
14. Iraz M, Ceylan A, Akkoyunlu Y. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter* türlerinde antibiyotik direnç oranlarının incelenmesi. ANKEM Derg 2012; 26(2): 80-5.
15. Seifert H, Stefanik D, Wisplinghoff H. Comparative in vitro activities of tigecycline and 11 other antimicrobial agents against 215 epidemiologically defined multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. J Antimicrob Chemother 2006; 58(5): 1099-100.
16. Bou G, Cerveró G, Domínguez MA, Quereda C, Martínez-Beltrán J. PCR-based DNA fingerprinting (REP-PCR, AP-PCR) and pulsed-field gel electrophoresis characterization of a nosocomial outbreak caused by imipenem- and meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. Clin Microbiol Infect 2000; 6(12): 635-43.
17. Grisold AJ, Zarfel G, Strenger V, et al. Use of automated repetitive-sequence based PCR for rapid laboratory confirmation of nosocomial outbreaks. J Infect 2010; 60(1): 44-51.
18. Ergin A, Hascelik G, Eser OK. Molecular characterisation of oxacillinases and genotyping of invasive *Acinetobacter baumannii* isolates using repetitive extragenic palindromic sequence-based polymerase chain reaction in Ankara between 2004 and 2010. Scand J Infect Dis 2013; 45(1): 26-31.
19. Çalışkan A. *Acinetobacter*'lerde direnç ve klonal ilişkinin araştırılması. Uzmanlık Tezi, 2008. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Malatya.
20. Wang H, Guo P, Sun H, et al. Molecular epidemiology of clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. from Chinese hospitals. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51(11): 4022-8.