



ارزیابی حضور ژن‌های انتقالی مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های وابسته به پلاسمید در جزایر ژنومی آسینتوباکتر بومانی جدا شده از نمونه‌های کلینیکی

سجاد علیزاده: دانشجوی دکتری تخصصی میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کازرون، فارس، ایران
مجید باصری صالحی: دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کازرون، فارس، ایران (* نویسنده مسئول)
majidbaserisalehi682@gmail.com
نیما بهادر: دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز، فارس، ایران

چکیده

کلیدواژه‌ها

مقاومت آنتی‌بیوتیکی،
مقاومت چند دارویی،
بتالاکتاماز AmpC،
آسینتوباکتر بومانی

زمینه و هدف: آسینتوباکتر بومانی یکی از مهم‌ترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی است. توانایی فوق‌العاده در کسب مقاومت دارویی در مقابل طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها را دارد. سویه‌های مقاوم به چند دارو MDR و تولیدکننده بتالاکتاماز AmpC این باکتری، عامل بیماری‌های عفونی جدی در بخش‌های مختلف بیمارستانی و در افراد بستری می‌باشد و درمان این عفونت‌ها به علت مقاومت گسترده نسبت به داروهای ضد میکروبی با مشکلات جدی مواجه است. هدف از مطالعه تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آسینتوباکتر بومانی و بررسی احتمال وجود ژن‌های کروموزومی و پلاسمیدی مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها در جزایر ژنومی این باکتری بود.

روش کار: در این مطالعه ۶۰ ایزوله از گونه‌های آسینتوباکتر بومانی از نمونه‌های بالینی جمع‌آوری شد. آزمون حساسیت ضد میکروبی با استفاده از روش دیسک دیفیوژن و روش PCR برای شناسایی ژن‌های کروموزومی و پلاسمیدی مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها (cit، dha و mox) انجام شد.

یافته‌ها: بیشترین مقاومت در آمپی‌سیلین (۹۸/۳٪) و کمترین مقاومت در کولیسیتین (۳۵٪) بود. مقاومت بیش از ۹۰٪ در ۱۲ آنتی‌بیوتیک از ۱۵ آنتی‌بیوتیک مشاهده شد. ۶۰ ایزوله ۹۸/۳۴٪ نسبت به بیش از ۸ آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند و فقط یک نمونه به همه حساس بود. فراوانی ژن‌های cit، dha و mox به ترتیب ۱ (۲٪)، ۷ (۱۲٪) و ۲۷ (۴۶٪) بود. ۲۴ ایزوله (۴۰٪) برای هر سه ژن منفی بودند. فراوانی ایزوله‌های حاوی ژن‌های mox با مقاومت آنتی‌بیوتیکی رابطه مستقیم داشت ($P \leq 0.05$).

نتیجه‌گیری: نتایج نشان دهنده درصد بالای فراوانی ژن‌های mox است که با مقاومت آنتی‌بیوتیکی رابطه مستقیم دارد. با این حال حضور این ژنها و رابطه آنها با میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی نیاز به بررسی بیشتری دارد. مقاومت بالای آسینتوباکتر بومانی به آنتی‌بیوتیک‌ها بسیار نگران کننده بود، زیرا کنترل و درمان این باکتری را مشکل می‌سازد. تنها آنتی‌بیوتیک موثر قابل استفاده در درمان عفونت‌های مرتبط کولیسیتین می‌باشد که مقاومت به آنهم در حال افزایش است.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت‌کننده: حامی مالی ندارد.

شیوه استناد به این مقاله:

Alizadeh S, Baserisalehi M, Bahador N. Evaluation of the Possibility of Chromosomal and Plasmid-Dependent Antibiotic-Transferable Genes in Acinetobacter Genomic Isolates Isolated from Clinical Specimens and genotype. Razi J Med Sci. 2022;29(6):12-24.

*انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.

Evaluation of the Possibility of Chromosomal and Plasmid-Dependent Antibiotic-Transferable Genes in *Acinetobacter* Genomic Isolates Isolated from Clinical Specimens and genotype

Sajjad Alizadeh: PhD Student, Microbiology Department, Science Faculty, Islamic Azad University, Kazeroon Branch, Fars, Iran

Majid Baseri Salehi: Associate Professor, Microbiology Department, Science Faculty, Islamic Azad University, Kazeroon Branch, Fars, Iran (* Corresponding author) majidbaserisalehi682@gmail.com

Nima Bahador: Associate Professor, Microbiology Department, Science Faculty, Islamic Azad University, Shiraz Branch, Fars, Iran

Abstract

Background & Aims: *Acinetobacter baumannii* is an opportunistic pathogen and a component of gram-negative, aerobic, and non-fermentative gram-negative bacteria, which is found in the form of cocci or coccobacilli. Because these bacteria have few nutrients to grow, they can survive long periods in adverse conditions, on dry surfaces, as well as in aquatic environments. *Acinetobacter* is probably known as gram-negative bacteria on the surface of the genus. These organisms are difficult to stain and are often mistaken for gram-positive. Among the gram-negative bacteria that cause nosocomial infections (especially in the intensive care unit of the ICU), *Acinetobacter* species have received a great deal of attention over the last three decades (1-3).

Acinetobacter baumannii OmpA binds to the host epithelium and mitochondria, causing mitochondrial dysfunction and swelling that is followed by the release of cytochrome c, leading to the formation of apoptosis, all of which contribute to cell apoptosis. OmpA, the most abundant surface protein in the pathogen, is also involved in complement resistance and biofilm formation. Key stress survival strategies and the potential for important virulence factors help increase bacterial survival inside and outside the host (1, 4). Most chromosomal AmpC beta-lactamases are found in *Enterobacter*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* and, *Citrobacter* species. These enzymes belong to the Ambler classification and include the genes *cmy*, *fox*, *mox*, *dha*, *acc*, *mic*, family / related *bla* / *lat* (*cit* and *act*, *mir* (related to the *ebc* family)). They are (5). It is noteworthy that at tigecycline resistance levels in *Acinetobacter baumannii* isolates, its efficacy may be increased during treatment with tigecycline if the drug is exposed for a short time. Recently, mutations in the *trm* gene, encoding methyltransferases, have been associated with decreased tigecycline sensitivity in one *Acinetobacter baumannii* strain (6). Most strains of *Acinetobacter baumannii* are resistant to ampicillin, amoxicillin-clavulanic acid, anti-staphylococcal penicillins, broad-spectrum cephalosporins (except ceftazidime and cefepime), tetracycline, and, tetracycline. MDR resistance in *Acinetobacter* strains has become a global and growing problem. In previous studies in Iran, the rate of multidrug resistance has been more than 60% (7).

Methods: A total of 240 clinical samples (including blood, urine, sputum, respiratory secretions, urine, wounds, skin, etc.) were collected from patients admitted to different wards of Dey Hospital in Tehran. Samples were collected from patients who had been hospitalized for at least three days and had acquired the infection in a hospital setting and were transferred to a microbiology laboratory for evaluation. For initial isolation, clinical specimens were cultured linearly in McConkey Agar and Bloodagar media containing 5% sheep blood and incubated at 37 °C for 24-48 hours (9). After the incubation period, the cultures were examined for macroscopic characteristics (appearance of the colonies) and microscopy using a hot staining technique. Then gram-negative bacilli were analyzed using biochemical tests.

Keywords

Antibiotic resistance,
Multidrug resistance,
AmpC beta-lactamases,
Acinetobacter baumannii

Received: 25/06/2022

Published: 27/08/2022

In order to extract the plasmid, the extraction kit made by Sina Clone Company, Iran was used. First, a colony of each isolate cultured on Müller-Hinton agar medium (manufactured by Merck, Germany) was inoculated with 5 ml of Luria Bertani Broth culture medium (manufactured by Sigma-Aldrich, USA) and stored for 13 hours in Incubated at 39 ° C. Then, the plasmid extraction steps were performed using the Cinnagen kit protocol. It should be noted that the resulting plasmids were stored at -20 ° C until PCR.

Results: According to the results in Table 6, the higher the number of isolates containing *mox* gene, the more antibiotic resistance is observed. In fact, a significant relationship was found between the presence of this gene and antibiotic resistance. For colistin, which had the lowest resistance ratio of this antibiotic, fewer isolates had this gene. (Significance level 0.563) A semi-sensitive to colistin isolate containing both *ox* *mox*. Genes. One of the semi-sensitive isolates containing *cefpeme* contained only *dha* and no semi-susceptible isolates contained *cit* gene (significance level 0.853). With 1, 5 and, 14 isolates containing *dha*, *cit* and *mox* genes (significance level 0.802) (Table 6).

Conclusion: Previous studies have shown that resistance to various antibiotics is on the rise. For example, studies by Wang et al. (23) and Esmoliako et al. (24) in recent years have shown that most strains were sensitive to amikacin, ampicillin, sulbactam, ceftazidime, cefpime, gentamicin, imipenem, meropenem, piperacillin, tazobactam. . In contrast to the present study, which found a 98.3% resistance to ampicillin and the highest resistance among all antibiotics studied, Karimi et al. reported a sensitivity of 91.6% to ampicillin in 2020. Consistent with the results of the present study, the results of the study of money changers and colleagues (2019) in Shahrekord have also shown a high prevalence of resistance to carbapenems, imipenem 78% and meropenem 44%. In this study, *Acinetobacter baumannii* had the highest resistance to cefpime and ceftazidime (100%) and the lowest resistance to tobramycin and meropenem (22). In the study of Karimi et al., The resistance to meropenem was 83.3% and to ceftazidime was 93.3%. (19) Salehnia et al. In their study showed 100% resistance to cefpime (7).

According to the antibiogram results of the present study and also the results of the mentioned studies, to date, some strains of *Acinetobacter baumannii* have become resistant to all common antibiotics used, which greatly limits the treatment of these infections. The only effective antibiotic used to treat infections associated with this bacterium is colistin, which is also increasing its resistance. In general, the findings of the present study indicate an increase in antibiotic resistance compared to previous studies. This high prevalence of resistance is due to the unnecessary prescription of antibiotics and the lack of appropriate infection control tools. This is very important in identifying antibiotic resistance genes. In addition, the selection of appropriate antibiotics based on antibiogram plays an important role in treating and preventing the spread of drug resistance.

The results show a high percentage of *MOX* genes that are directly related to antibiotic resistance, however, the presence of these genes and their relationship with antibiotic resistance need further investigation. The high resistance of *Acinetobacter baumannii* to antibiotics was very worrying because it is difficult to control and treat this bacterium. The only effective antibiotic used to treat infections associated with this bacterium was colistin, which is also increasingly resistant.

Conflicts of interest: None

Funding: None

Cite this article as:

Alizadeh S, Baserisalehi M, Bahador N. Evaluation of the Possibility of Chromosomal and Plasmid-Dependent Antibiotic-Transferable Genes in *Acinetobacter* Genomic Isolates Isolated from Clinical Specimens and genotype. Razi J Med Sci. 2022;29(6):12-24.

*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

مقدمه

/اسینتوباکتر بومانی (*Acinetobacter baumannii*) یک پاتوژن فرصت طلب و جزء باکتری های گرم منفی، هوازی و غیر تخمیری است که به صورت کوکسی و یا کوکوباسیل دیده می شود. از آنجا که این گونه باکتریایی نیازمندی های غذایی کمی برای رشد دارند، می توانند در شرایط نامساعد، سطوح خشک و همچنین محیط آبی به مدت طولانی زنده بمانند. اسینتوباکترها به عنوان باکتری های گرم منفی شناخته شده و رنگ آمیزی این ارگانیسم ها دشوار است و اغلب به طور اشتباه گرم مثبت دیده می شوند. در میان باکتری های گرم منفی که باعث عفونت های بیمارستانی (به ویژه در بخش مراقبت های ویژه -ICU) می گردند، گونه های اسینتو باکتر توجه زیادی را طی سه دهه اخیر به خود معطوف داشته اند (۱-۳).

/اسینتوباکترها در طیف گسترده ای از عفونتهای جدی در بیمارستان و بویژه سوختگی ها دخیل هستند. به عنوان مثال باکتری می، ذات الریه بیمارستانی، عفونت های مجاری ادراری، مننژیت ثانویه و لسی نقش برجسته آنها را ایجاد پنهومونی بیمارستانی به ویژه پنهومونی ایجاد شده در دستگاه تنفسی فوقانی بیماران بستری شده در بخش های مراقبت ویژه می باشد. پنهومونی همراه با ونتیلاتور (VAP - Ventilator associated pneumonia) معمولاً با عفونت در ارتباط است (۲). مدت طولانی بستری شدن در بیمارستان، مدت زمان طولانی تهویه مکانیکی و استفاده قبلی از آنتی بیوتیک ها از عوامل شناخته شده در افزایش خطر ابتلا به VAP ناشی از اسینتو باکتر هستند. ونتیلاتورهای آلوده یا تجهیزات مراقبت های تنفسی و همچنین انتقال داخل بیمارستانی نیز ممکن است در ابتدای شیوع بیماری نقش داشته باشد (۱-۳).

پلاسمیدهای قابل انتقال دارای ژن هایی هستند که آنزیم های AmpC را کد می کنند. این پلاسمیدها می تواند در باکتری هایی که ژن های کروموزومی AmpC را ندارند (مانند کلیسیلا) یا اگر دارند بیان این آنزیم ها در آنها ضعیف است (مانند اشرشیاکلی) منتقل شوند و باعث گسترش این ژن ها در میان باکتری ها شوند (۴). همچنین OmpA که فراوان ترین پروتئین سطحی در پاتوژن است، در مقاومت به کمپلمان و تشکیل بیوفیلم

شرکت دارد. استراتژی های کلیدی بقای استرس و پتانسیل فاکتورهای مهم ویروالانس، به افزایش زنده ماندن باکتری در داخل و خارج از میزبان کمک می کنند (۱، ۴). اکثر بتالاکتامازهای AmpC کروموزومی در انتروباکتر، سراشیا، سودوموناس، اسینتوباکتر و گونه های سیتروباکتر وجود دارند. این آنزیم ها در تقسیم بندی آمبلر در گروه C قرار می گیرند و شامل ژن های cmx، fox، dha، acc، mic، lat/bil مرتبط با خانواده cit و act، mir (مرتبط با خانواده ebc) می باشند (۵).

فعالیت تیگاسایکلین علیه /اسینتوباکتر بومانی به طور کلی خوب است و نتایج موفقیت آمیز بالینی در این باره گزارش شده است. مقاومت به این آنتی بیوتیک در چندین مطالعه ذکر شده است که ممکن است به دلیل تنظیم پمپ افلاکس در چند دارو توسط پمپ AdeABC باشد. اخیراً گزارش شده است که جهش در ژن trm، کد گذاری کننده متیل ترانسفراز با کاهش حساسیت به تیگاسایکلین در یک سویه /اسینتوباکتر بومانی مرتبط است (۶).

اکثر سویه های /اسینتوباکتر بومانی به آمپی سیلین، آموکسی سیلین-کلاولانیک اسید، پنی سیلین های ضد استافیلوکوکی، سفالوسپورین های با طیف وسیع (به جز سفتازیدیم و سفی پیم)، تتراسایکلین، ماکرولیدها، ریفامپین و کلرامفنیکل مقاوم هستند. مقاومت MDR در سویه های اسینتوباکتر به یک مشکل جهانی و روبه رشد تبدیل شده است. در عوض کلیستین در گروه آنتی بیوتیک های لیپوپپتیدی قرار دارد که پلی میکسین E نیز نامیده می شود. در مطالعات قبلی در ایران میزان مقاومت چند دارویی بیش از ۶۰ درصد بوده است (۷). یکی از مکانیسم های مهم ایجاد مقاومت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام در باکتری های گرم منفی از جمله /اسینتوباکتر بومانی، تولید آنزیم های بتالاکتامازی می باشد (۵).

سویه های /اسینتوباکتر بومانی MDR، یعنی سویه هایی از /اسینتوباکتر بومانی که به سه کلاس آنتی بیوتیکی رایج مقاوم باشند. در مطالعات اخیر، این سه کلاس آنتی بیوتیک به نامهای پنی سیلین یا سفالوسپورین، آمینوگلیکوزید و کوئینولون مشخص شدند. سویه هایی از /اسینتوباکتر بومانی که علاوه بر

مقاومت به سه کلاس آنتی‌بیوتیکی رایج، به ایمی پنم نیز مقاوم باشند، XDR (drug resistant Extreme) گفته می‌شود. چنانچه یک ایزوله /سینتوباکتر بومانی علاوه بر همه آنتی‌بیوتیک‌های فوق، مقاومت به پلی میکسین‌ها و تیگه‌سیکلین را به دست آورد PDR خوانده می‌شود (۸). هدف از انجام این تحقیق ارزیابی وجود ژن‌های انتقالی مقاوم آنتی‌بیوتیکی وابسته به پلاسمید در جزایر ژنومی /سینتوباکتر بومانی جدا شده از نمونه‌های کلینیکی است.

روش کار

تعداد ۲۴۰ نمونه بالینی (شامل خون، ادرار، خلط، ترشحات تنفسی، ادرار، زخم، پوست) از بیماران بستری در بخش‌های مختلف بیمارستان دی شهرتهران جمع‌آوری شد. نمونه‌ها از بیمارانی که حداقل به مدت سه روز در بیمارستان بستری شدند جمع‌آوری و جهت ارزیابی به آزمایشگاه میکروبیولوژی انتقال داده شد. برای جداسازی اولیه، نمونه‌های بالینی در محیط‌های کشت مک‌کانکی آگار و بلادآگار حاوی ۵٪ خون گوسفند به صورت خطی کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، به مدت ۴۸-۲۴ ساعت انکوبه شد (۹). پس از طی مدت زمان انکوباسیون، کشت‌ها از نظر ویژگی‌های ماکروسکوپی (مشخصات ظاهری کلونی‌ها) و میکروسکوپی با کمک تکنیک رنگ‌آمیزی گرم بررسی شدند. سپس با سیل‌های گرم منفی به کمک آزمونهای بیوشیمیایی و فنوتیپی مورد آنالیز قرار گرفت. از تست PCR نیز برای تایید نهایی استفاده گردید.

شناسایی جدا‌ی‌ها بر اساس تست بیوشیمیایی:

تعیین هویت /سینتوباکتر بومانی با انجام تست‌های بیوشیمیایی مختلف مطابق با کتابهای مرجع از جمله تست‌های واکنش گرم (-)، واکنش آلکالین / آلکالین در محیط TSI (Triple Sugar Iron) و SIM (Sulfide) (Indo Motility Medium)، تست اکسیداز (-)، تحرک (-)، تست کاتالاز (+)، آزمایش سترات (+) تولید اسید از گلوکز در محیط OF صورت گرفت (۱۰).

تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن و میکرودایلوشن: جهت بررسی

میزان حداقل غلظت (رقت) مهارکننده و میزان حداقل غلظت (رقت) کشنده باکتری‌ها از محیط کشت‌های بلاد آگار، مولر هینتون براث استفاده شد. در این تکنیک ۱۰۰ µl از محیط کشت مولر هینتون براث در تمام چاهک‌ها (Wells) وارد کرده و سپس ۱۰۰ µl از آنتی بیوتیک موردنظر به چاهک ابتدایی افزوده و اقدام به رقت سازی نموده تا خانه دهم رسیده و به همان اندازه ابتدایی خارج شد. در مرحله بعد ۱۰۰ µl از سوسپانسیون میکروبی به تمام چاهک‌ها اضافه شد.

حساسیت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از روش دیسک دیفیوژن بر روی محیط مولر هینتون آگار با توجه به دستورالعمل‌های CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) سال ۲۰۱۸ انجام شد. بعد از ایزوله کردن از کلنی‌های موجود در محیط بلاد آگار کشت ۲۴ ساعته تهیه شد. در انتها پلیت‌ها به صورت واژگون جهت جلوگیری از تعریق سطح پلیت به انکوباتور ۳۵ درجه سانتی‌گراد انتقال داده و نتایج پس از ۱۸ ساعت مورد بررسی قرار گرفت.

دیسک‌های مورد استفاده در این پژوهش مربوط به شرکت ROSCO کشور دانمارک بود. دیسک‌ها در یخچال ۸ درجه سانتیگراد و پایین‌تر، یا در فریز ۱۴- درجه سانتیگراد و پایین‌تر تا زمان مصرف نگهداری شدند. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی یک تا دو ساعت قبل از استفاده از یخچال یا فریزر خارج شدند تا به درجه حرارت اتاق برسند. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک از دسته بندی‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی شامل آمپی‌سیلین؛ با علامت اختصاری AM (۱۰ µg)، سفوتاکسیم؛ CTX (۳۰ µg)، کلرامفنیکل؛ C (۳۰ µg)، سفتریاکسون؛ CRO (۳۰ µg)، سفتازیدیم؛ CAZ (۳۰ µg)، مروپنم؛ MEN (۱۰ µg)، تیکارسیلین؛ TIC (۷۵ µg)، جنتامایسین؛ GM (۱۰ µg)، سیپروفلوکسایین؛ CP (۵ µg)، سفپیم؛ FEP (۳۰ µg)، پیپراسیلین؛ PIP (۱۰ µg)، آمیکاسین؛ AN (۳۰ µg)، توبرامایسین؛ OB (۱۰ µg)، کولیستین؛ CL (۱۰ µg) بودند (۱۱).

تهیه سوسپانسیون میکروبی: به کمک سوپ ۳-۴ کلنی میکروبی را برداشته و داخل یک لوله حاوی سرم فیزیولوژی به صورت سوسپانسیون درآورده شد تا

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده جهت انجام روش PCR (۱۲)

پرایمر	توالی (۵' به ۳')	اندازه محصول (bp)
<i>moxmf</i>	GCT GCT CAA GGA GCA CAG GAT	۵۲۰
<i>moxmr</i>	CAC ATT GAC ATA GGT GTG GTG C	
<i>citmf</i>	TGG CCA GAA CTG ACA GGC AAA	۴۶۲
<i>citmr</i>	TTT CTC CTG AAC GTG GCT GGC	
<i>dhamf</i>	AAC TTT CAC AGG TGT GCT GGG T	۴۰۵
<i>dhamr</i>	CCG TAC GCA TAC TGG CTT TGC	

جدول ۲- برنامه زمانی- حرارتی Multiplex PCR برای ژن‌های پلاسمیدی

مرحله	دما (درجه سلسیوس)	زمان (ثانیه)	تعداد سیکل
واسرشت اولیه	۹۴	۶۰۰	۳
واسرشت	۹۴	۳۰	-
اتصال	۶۴	۶۰	-
بازآرایی (گسترش)	۷۲	۶۰	۲۵
بازآرایی نهایی	۷۲	۴۲۰	۱

واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR): همچنین واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) برای شناسایی ژن‌های کد کننده آنزیم‌های بتالاکتامازی AmpC پلاسمیدی با استفاده از پرایمرهای موجود در جدول ۱ و همچنین تکنیک Multiplex با حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر در لوله‌های دیواره نازک ۰/۵ میلی لیتری انجام شد و از برنامه حرارتی - زمانی مطابق جدول ۲ استفاده گردید.

آماده سازی پرایمرها: پس از مراجعه به سایت زیر و مطالعه و جستجو در مقالات مختلف پرایمرهای مناسب برای ژن‌های *cit.dha* و *mox* انتخاب شدند.

پرایمرها (۱۲) از طریق سایت (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) مقایسه و بلاست شده و به شرکت سیناژن سفارش داده شد. پرایمرها توسط آب مقطر دیونیزه به غلظت ۱۰۰ پیکومول و سپس به غلظت مناسب که ۱۰ پیکومول بود، رسید (جدول ۱ و ۲).

تجزیه و تحلیل داده‌ها: داده‌ها به کمک نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ و Excel و آزمون کای دو و فیشرتجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی داری، کمتر یا مساوی ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. ($p=0/05$).

کدورتی به اندازه کدورت لوله استاندارد نیم مک فارلند به دست آید. اگر سوسپانسیون میکروبی رقیق باشد قطر هاله عدم رشد بزرگتر و اگر غلیظ تر از استاندارد باشد هاله عدم رشد کمتر خواهد بود که این نکته نیز مورد توجه قرار گرفت. بعد از ایزوله کردن باکتری، به دلیل اینکه به کار بردن تعداد کم و یا زیاد باکتری منجر به یافته‌های اشتباه خواهد شد، استفاده از تعداد مناسب باکتری مورد آزمایش بسیار مهم است؛ بنابراین باید پس از آماده سازی سوسپانسیون باکتری از روش کدورت سنجی استفاده شود و تعداد تقریبی باکتری در آن محلول را مشخص نمود.

شنا سایی مولکولی ژن‌های بتالاکتاماز: به منظور استخراج پلاسمید، از کیت استخراج ساخت شرکت سینا کلون، کشور ایران استفاده شد. ابتدا یک کلنی از هر ایزوله کشت داده شده روی محیط مولر هینتون آگار (ساخت شرکت Merck، کشور آلمان) با ۵ میلی لیتر محیط کشت لوریا برتانی براث (ساخت شرکت Sigma-Aldrich، کشور آمریکا) تلقیح و به مدت ۱۳ ساعت در دمای ۳۹ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. سپس، مراحل استخراج پلاسمید با استفاده از پروتکل کیت سینا کلون انجام شد. ذکر این نکته ضرورت دارد که پلاسمیدهای حاصل تا زمان انجام آزمایش PCR در دمای ۲۰- درجه ذخیره سازی گردید.

یافته‌ها

جداسازی و شناسایی اسپینتوباکترها توسط

ویژگی‌های بیوشیمیایی: از بین ۲۴۰ نمونه جمع‌آوری شده، ۶۰ ایزوله/اسپینتوباکتر بومانی شناسایی شد. نتایج بررسی ماکروسکوپی و میکروسکوپی ایزوله‌های اسپینتوباکتر را نشان می‌دهد. ویژگی بیوشیمیایی اسپینتوباکترها شامل اکسیداز منفی، سیترات مثبت، SIM منفی و TSI بصورت ALK/ALK بود. از ۲۴۰ ایزوله بدست آمده ۶۰ ایزوله/اسپینتوباکتر بومانی شناسایی شد که بیشترین تعداد ایزوله‌های بدست آمده از نمونه‌های نای به میزان ۲۸ نمونه (۴۶/۶ درصد) بود ولی تعداد باقی نمونه‌ها به شرح جدول ۳ می‌باشد. تعداد زیادی نمونه از بخش ICU عمومی (۱۱ نمونه از بیماران زن و ۱۴ نمونه از بیماران مرد) و تعداد یک

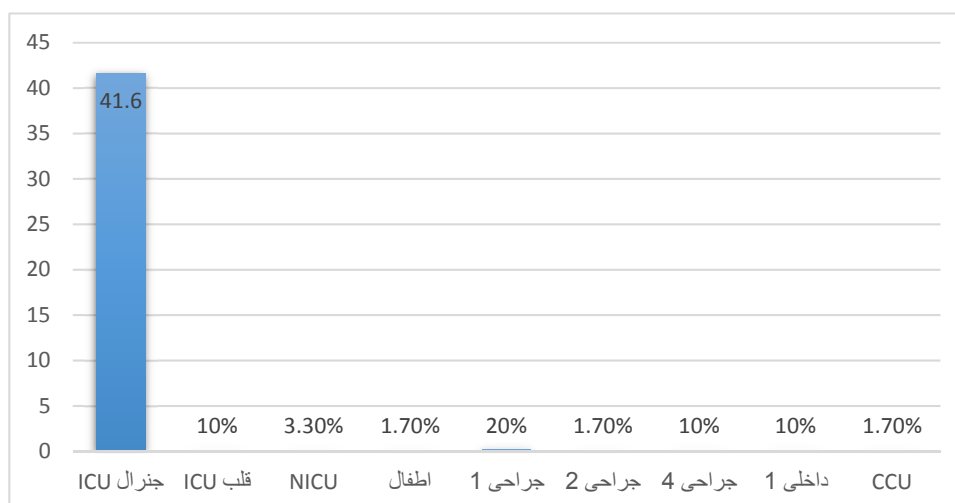
نمونه از یک بیمار مرد بستری در CCU بدست آمد (جدول ۳ و نمودار ۱).

ایزوله‌ها از ۲۷ زن و ۳۳ مرد بیمار بستری شده در بیمارستان بدست آمد. تعداد نمونه مقاومت دارویی (۹ نمونه) از بیماران بستری شده به دلیل مشکلات قلبی دیده شد و تعداد (۱ نمونه) مقاومت دارویی از بیماران بستری شده به علت تنگی نفس، جراحی پلاستیک، جراحی دریچه آئورت و زایمان بود (نمودار ۲).

الگوی مقاومت و حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های اسپینتوباکتر بومانی بر حسب نوع آنتی‌بیوتیک: طبق نتایج بدست آمده از میان ۱۵ آنتی‌بیوتیک انتخابی بیشترین مقاومت نسبت به آمپی‌سیلین (۹۸/۳٪) و کمترین مقاومت نسبت به کولیسیتین (۳۵٪) مشاهده شد. در بین ایزوله‌های بدست آمده ۱ نمونه به

جدول ۳- توزیع فراوانی ایزول‌های اسپینتوباکتر بومانی به تفکیک نوع نمونه

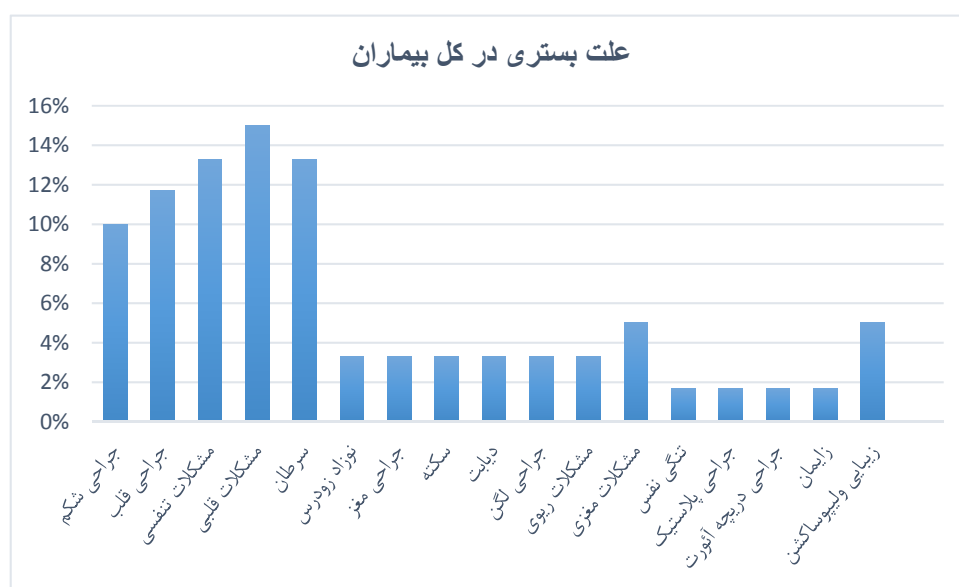
نوع نمونه	تعداد باکتری	درصد
خلط سینه	۵	۸٪/۲
گلو	۶	۱۰٪
نای	۲۸	۴۶٪/۶
کشت ادرار	۴	۶٪/۷
نمونه از سایر قسمت‌های بدن	۹	۱۵٪
نمونه از زخم سینه و شکم	۱+۲	۵٪
نمونه از کاتتر و سوندها	۲	۳٪/۴
سایر اندامها	۳	۵٪/۱



نمودار ۱- درصد ایزوله‌های بدست آمده از بیماران به تفکیک بخش‌های بستری

جدول ۴- درصد فراوانی ایزوله‌های بدست آمده از بیماران به تفکیک جنسیت در بخش‌های بستری

بخش‌های بستری	زن		مرد		کل	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
ICU جنرال	۱۱	۴۰/۸٪	۱۴	۴۲/۴۵٪	۲۵	۴۱/۶٪
ICU قلب	۳	۱۱/۱٪	۳	۹/۱٪	۶	۱۰٪
NICU	۱	۳/۷٪	۱	۳٪	۲	۳/۳٪
اطفال	۱	۳/۷٪	۰	۰	۱	۱/۷٪
جراحی ۱	۱	۳/۷٪	۱۱	۳۳/۳٪	۱۲	۲۰٪
جراحی ۲	۱	۳/۷٪	۰	۰	۱	۱/۷٪
جراحی ۴	۶	۲۲/۲٪	۰	۰	۶	۱۰٪
داخلی ۱	۳	۱۱/۱٪	۳	۹/۱٪	۶	۱۰٪
CCU	۰	۰	۱	۳٪	۱	۱/۷٪



نمودار ۲- درصد فراوانی علت بستری بیماران

گرفتند (نمودار ۴).

طبق نتایج بدست آمده در جدول ۶ هر چه میزان تعداد ایزوله‌های حاوی ژن *mox* بیشتر بوده، مقاومت به آنتی‌بیوتیک کلیستین مورد بررسی بیشتر مشاهده شد. در واقع ارتباط معناداری بین حضور ژن و مقاومت آنتی‌بیوتیکی بدست آمد. برای کولیسستین کمترین میزان مقاومت نسبت این آنتی‌بیوتیک در بین نمونه‌ها مشاهده شد. تعداد ایزوله‌های کمتری دارای ژن مقاومت دارویی بودند (سطح معنی داری ۰/۵۳۶). یک ایزوله نیمه حساس به کولیسستین حاوی هر دو ژن *mox* بود. یک ایزوله نیمه حساس به سفپیم نیز فقط حاوی *dha* و

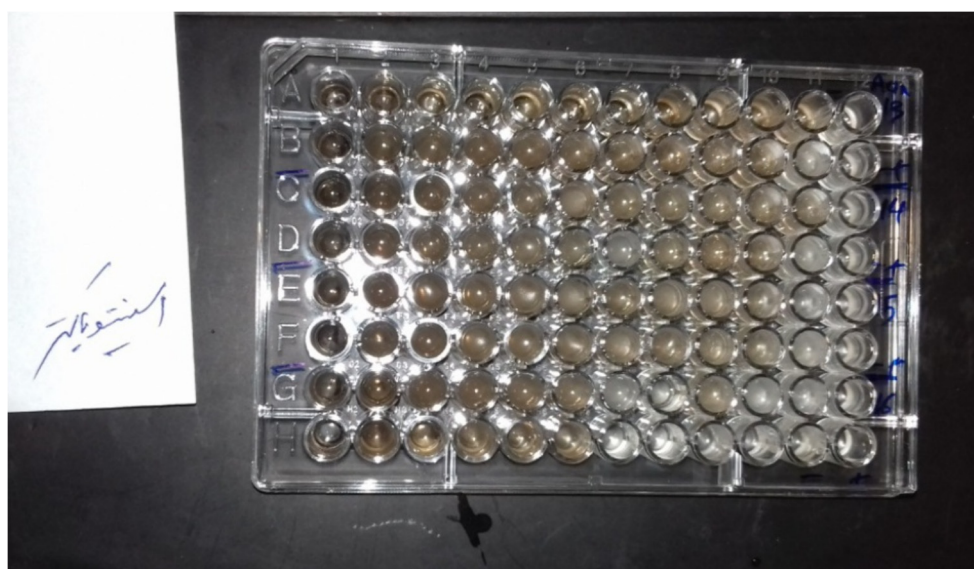
سفتازیدیم، پیپراسیلین و سفپیم نیمه‌حساس بودند. (تصویر ۱ و جدول ۵ و نمودار ۳).

نتایج PCR برای تشخیص ژن‌های بتالاکتامازی

AmpC از بین ۶۰ ایزوله بدست آمده ۱ نمونه برای ژن *dha*، ۲۷ نمونه برای ژن *mox* و ۷ نمونه برای ژن *cit* مثبت بودند و ۲۴ نمونه برای ژن‌های مورد بررسی منفی بودند و باعث تولید محصولاتی در اندازه‌های مورد انتظار شد که در الکتروفورز بر روی ژل آگارز به صورت باندهایی به ترتیب در محدوده‌های ۴۰۵bp برای *dha*، ۵۲۰bp برای *mox* و ۴۶۲bp برای *cit* آشکار شدند (شکل ۱) که با اطمینان ۹۵ درصد مورد بررسی قرار

جدول ۵- توزیع فراوانی الگوی مقاومت و حساسیت آنتی‌بیوتیکی در بیماران بستری در بخش‌های مختلف بیمارستان ها بر حسب نوع آنتی‌بیوتیک

آنتی بیوتیک	مقاوم		نیمه حساس		حساس	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
آمپی‌سیلین	۵۹	۹۸/۳٪	۰	۰	۱	۱/۷٪
سفتواکسیم	۵۸	۹۶/۷٪	۰	۰	۲	۳/۳٪
کلرامفنیکل	۵۸	۹۶/۷٪	۰	۰	۲	۳/۳٪
سفت‌ریاکسون	۵۸	۹۶/۷٪	۰	۰	۲	۳/۳٪
سفتازیدیم	۵۸	۹۶/۷٪	۱	۱/۷٪	۱	۱/۷٪
مروپنم	۵۸	۹۶/۷٪	۰	۰	۲	۳/۳٪
تیکارسیلین	۵۸	۹۶/۷٪	۰	۰	۲	۳/۳٪
جنتامایسین	۵۷	۹۵٪	۰	۰	۳	۵٪
سیپروفلوکساین	۵۶	۹۳/۳٪	۰	۰	۴	۶/۷٪
سفپیم	۵۵	۹۰٪	۱	۱/۷٪	۴	۶/۷٪
پیپراسیلین	۵۵	۷٪	۱	۱/۷٪	۴	۶/۷٪
آمیکاسین	۴۷	۷۸/۳٪	۰	۰	۱۳	۲۱/۷٪
توبرامایسین	۴۷	۷۸/۳٪	۰	۰	۱۳	۲۱/۷٪
کولیستین	۲۰	۳۳٪	۳	۳/۵٪	۳۷	۶۱/۷٪



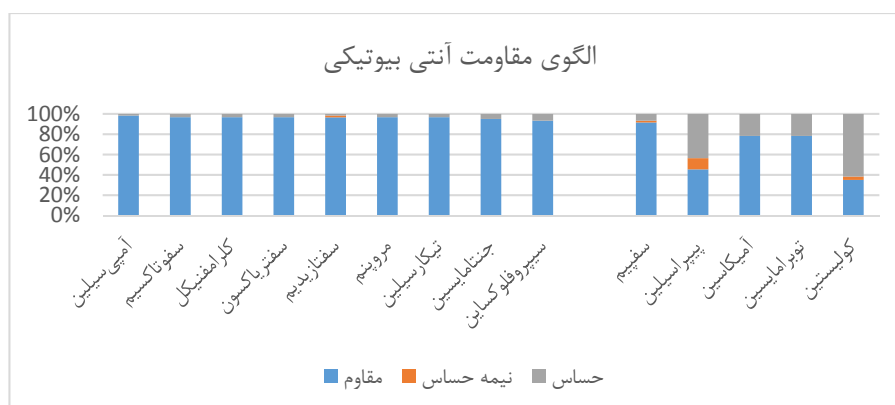
تصویر ۱- چاهک‌های میکروداپلو شن آنتی‌بیوتیکی به ترتیب: ردیف اول: تیکارسیلین، ردیف دوم: جنتامایسین، ردیف سوم: سیپروفلوکساین، ردیف چهارم: سفپیم، ردیف پنجم: پیپراسیلین، ردیف ششم: آمیکاسین، ردیف هفتم: توبرامایسین، ردیف هشتم: کولیستین.

بحث

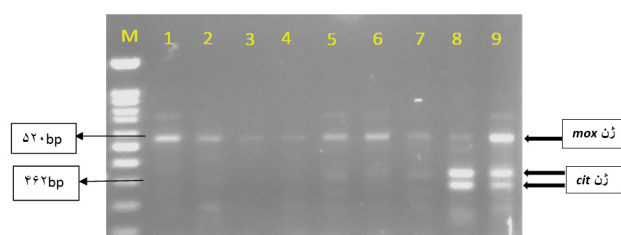
سویه‌های مقاوم به چند دارو در /سینتوباکتر بومانی و تولیدکننده بت‌لاکتاماز AmpC این باکتری، عامل بیماری عفونی جدی در بخش‌های مختلف بیمارستانی و در افراد بستری می‌باشند و درمان این چنین عفونت‌هایی به علت مقاومت گسترده نسبت به داروهای ضد میکروبی با مشکلات جدی مواجه است. این مطالعه با

هیچ ایزوله نیمه حساس حاوی ژن cit نبود (سطح معنی داری ۰/۸۵۳) بیشترین تعداد ایزوله‌های حساس حاوی سه ژن مورد بررسی در بین آنتی‌بیوتیک‌ها مربوط به کولیستین به ترتیب با ۱، ۵ و ۱۴ تعداد ایزوله حاوی ژن‌های cit.dha و mox بود (سطح معنی داری ۰/۸۰۲)

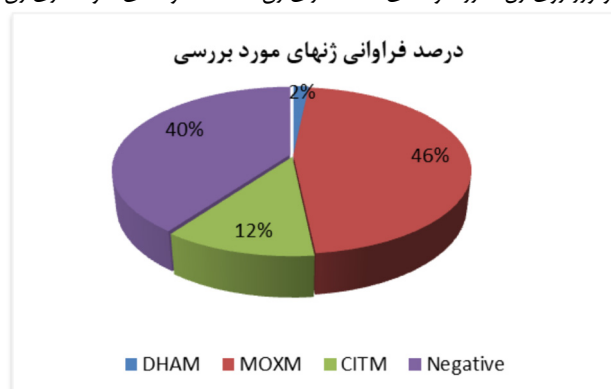
(جدول ۶).



نمودار ۳- الگوی مقاومت و حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی* بر حسب نوع آنتی بیوتیک



شکل ۱- محصول واکنش الکتروفورز روی ژل آگارز نمونه‌های ۱ تا ۹ دارای ژن *mox* نمونه‌های ۸ و ۹ دارای ژن *cit*، M مارکر ۱۰۰ جفت بازی



نمودار ۴- درصد فراوانی ژنهای مورد بررسی

بخش جراحی ۱ (۲۰٪) و جراحی ۴ و داخلی ۱ و ICU قلب (۱۰٪) بود. همچنین شایع‌ترین مکان جمع‌آوری نمونه‌ها نای با ۴۶/۶٪ بود. این نتایج همسو با مطالعات قبلی است که بیشترین تعداد ایزوله از بخش ICU و شایع‌ترین مکان جمع‌آوری نمونه آسپیره اندوتراشیال بوده است (۱۴-۱۸).

در حال حاضر حضور سویه‌هایی از این ارگانیسم با الگوی مقاومت دارویی چندگانه (MDR)، مقاومت دارویی گسترده (XDR) و نیز مقاومت دارویی همه جانبه (PDR) دارد. این امر در حال حاضر نیز مشکلات

هدف تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی و فراوانی سویه‌های مولد بتالاکتاماز AmpC در سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* جدا شده از نمونه‌های بالینی انجام گردید. تغییر در نفوذ پذیری پورین، سیستم‌های دفع آنتی بیوتیکی (Efflux Pump) و ترشح بتالاکتامازها از عوامل مقاومت آنتی بیوتیکی این باکتری هستند (۱۳).

در این پژوهش که از تمام بخش‌های موجود در بیمارستان نمونه به آزمایشگاه ارسال نمودند ۶۰ ایزوله *اسینتوباکتر بومانی* بدست آمد و بیشترین تعداد ایزوله‌ها مربوط به ICU جنرال (۴۱/۶ درصد) بود و پس از آن

جدول ۶- فراوانی ژن‌های مورد بررسی به تفکیک آنتی‌بیوتیک‌های مقاوم، نیمه‌حساس و حساس

آنتی بیوتیک	فراوانی ژن‌ها در نمونه‌های مقاوم			فراوانی ژن‌ها در نمونه‌های نیمه‌حساس			فراوانی ژن‌ها در نمونه‌های حساس		
	<i>dha</i>	<i>cit</i>	<i>Mox</i>	<i>dha</i>	<i>cit</i>	<i>mox</i>	<i>dha</i>	<i>cit</i>	<i>mox</i>
آمپی‌سیلین	۱	۰	۲۸	۰	۰	۰	۰	۰	۰
سفتواکسیم	۱	۰	۲۸	۰	۰	۰	۰	۰	۰
کلرامفنیکل	۱	۰	۲۸	۰	۰	۰	۰	۰	۱
سفتریاکسون	۱	۰	۲۷	۰	۰	۰	۰	۰	۱
سفتازیدیم	۱	۷	۲۸	۰	۰	۰	۰	۰	۰
مروپنم	۱	۰	۲۷	۰	۰	۰	۰	۰	۱
تیکارسیلین	۱	۰	۲۸	۰	۰	۰	۰	۰	۰
جنتامایسین	۱	۰	۲۸	۰	۰	۰	۰	۰	۰
سیپروفلوکسایین	۱	۰	۲۶	۰	۰	۰	۰	۰	۲
باکتریم	۱	۰	۲۷	۰	۰	۰	۰	۰	۱
سفپیم	۰	۷	۲۶	۰	۰	۰	۰	۰	۲
پیپراسیلین	۱	۷	۲۷	۰	۰	۰	۰	۰	۱
آمیکاسین	۱	۷	۲۶	۰	۰	۰	۰	۰	۲
توبرامایسین	۱	۰	۲۵	۰	۰	۰	۰	۰	۳
کولیستین	۰	۲	۱۲	۰	۰	۰	۲	۵	۱۴
ایمپنم	۱	۰	۲۸	۰	۰	۰	۰	۰	۰

در واقع ایزوله‌های باکتری به اکثر آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی مقاومت چشمگیری داشتند. بررسی مطالعات قبلی نیز نشان

می‌دهد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف سیر صعودی دارد. نتایج این مطالعه با یافته‌های مطالعات قبلی که اعلام کردند اکثر سویه‌های /سینتوباکتر بومانی جدا شده در ایران نسبت به داروهای خط اول درمان شامل آمینوگلیکوزیدها (جنتامایسین، آمیکاسین) سفتازیدیم، فلوروکینولونها (سیپروفلوکساسین) و کاربامپنم ها (ایمی پنم و مروپنم) مقاومت نشان می‌دهند، مطابقت دارد (۷، ۱۴، ۲۲-۱۹).

مطالعات وانگ و همکارانش (۲۳) و اسمولیاکاو و همکارانش (۲۴) در سالهای گذشته نشان داد که بیشتر سویه‌ها به آمیکاسین، آمپی‌سیلین، سولباکتام، سفتازیدیم، سفپیم، جنتامایسین، ایمی پنم، مروپنم، پیپراسیلین تازوباکتام حساس بودند. بر خلاف مطالعه حاضر که مقاومت ۹۸/۳ درصدی برای آمپی‌سیلین بدست آمد و بیشترین میزان مقاومت در بین تمامی آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی بود، کریمی و همکاران در سال ۲۰۲۰ حساسیت ۹۱/۶ درصدی برای

فراوانی را برای پزشکان در درمان بیماران آلوده به این ارگانیسم‌های مقاوم ایجاد کرده است (۱۴). مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های مقاوم به دسته‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی مانند آمینوگلوکوزیدها، بتالاکتام‌ها، فلوروکینولون‌ها، سفالوپورین‌ها باعث افزایش طول مدت بستری، هزینه‌های بستری و مرگ و میر می‌شود. درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری به دلیل مقاومت زیاد به طیف وسیع آنتی‌بیوتیک‌ها بسیار مشکل است (۱۹).

شناسایی و بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در هر منطقه از مهمترین عوامل جلوگیری از گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌باشد (۱۹). در مقایسه با نتایج مرتبط با الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در مطالعه حاضر نشان داد که ایزوله‌های /سینتوباکتر بومانی بدست آمده از بخش‌های مختلف بیمارستان دارای بیشترین میزان مقاومت به آمپی‌سیلین (۹۸/۳ درصد) و کمترین میزان مقاومت نسبت به کولیستین (۳۵ درصد) و توبرامایسین و آمیکاسین (۷۸/۳ درصد) بودند. در ۱۲ آنتی‌بیوتیک از ۱۵ آنتی‌بیوتیک مورد بررسی مقاومت بالای ۹۰ درصد مشاهده شد.

عفونت‌های مرتبط با این باکتری کولیسستین بود که مقاومت به آن هم در حال افزایش است.

تقدیر و تشکر

این مقاله که استخراج از پایان نامه دکترای تخصصی با کد ۹۵۰۴۵۳۰۹۶۸۷ بوده حاصل فعالیت آزمایشگاهی میکروبیولوژی است و بدینوسیله از کلیه عزیزانی که در انجام این فعالیت علمی راهنمایی مفید و ارزنده داشتند قدردانی و تشکر می‌گردد.

References

- Howard A, O'Donoghue M, Feeney A, Sleator RD. *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. *Virulence*. 2012;3(3):243-50.
- Garnacho-Montero J, Ortiz-Leyba C, Fernández-Hinojosa E, Aldabó-Pallás T, Cayuela A, Marquez-Vácaro JA, et al. *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia: epidemiological and clinical findings. *Intensive Care Med*. 2005;31(5):649-55.
- Luna CM, Aruj PK. Nosocomial *acinetobacter* pneumonia. *Respirology*. 2007;12(6):787-91.
- Choi CH, Lee EY, Lee YC, Park TI, Kim HJ, Hyun SH, et al. Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. *Cell Microbiol*. 2005;7(8):1127-38.
- Akya A, Eahi A, Chegenelorestani R, Hamzavi Y. Antibiotic Resistance and Phenotypic and Genotypic Detection of AmpC Beta-Lactamases among *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Kermanshah Medical Centers. *Qom Univ Med Sci*. 2019;12(11):40-9.
- Potron A, Poirel L, Nordmann P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Int J Antimicrob Agents*. 2015;45(6):568-85.
- Salehnia A, Nojomi F. Phenotypic study of Extended-spectrum Beta lactamase (ESBL) producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in patients referred to a military hospital in Guilan province. *Cell Res*. 2020;32(4):578-90.
- Khaledi A BA, Mansoori N, Ghazali Bina M, Ghazvini K. Determination of antimicrobial resistance pattern of *Acinetobacter baumannii* isolated from patients in intensive care unit (ICU). *Med J Mashhad Univ Med Sci*. 2015;58(7):376-80.
- Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G. Textbook

آمپی‌سیلین گزارش کردند.

همسو با نتایج مطالعه حاضر، نتایج مطالعه صرافان و همکاران (۲۰۱۹) در شهرکرد نیز شیوع بالایی از مقاومت به کارباپنمها، ایمپینم ۷۸ در صد و مروپنم ۴۴ درصد را نشان داده است. در این مطالعه بالاترین میزان مقاومت /سینتوباکتر بومانی به آنتی‌بیوتیک‌های سفپیم و سفتازیدیم (۱۰۰ درصد) و کمترین میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های توبرامایسین و مروپنم بود (۲۲). در مطالعه کریمی و همکاران میزان مقاومت به مروپنم ۸۳/۳ درصد و سفتازیدیم ۹۳/۳ درصد بوده است (۱۹). صالح‌نیا و همکاران نیز در مطالعه خود مقاومت ۱۰۰ درصدی به سفپیم را نشان دادند (۷).

با توجه به نتایج آنتی‌بیوگرام مطالعه حاضر و همچنین نتایج مطالعات ذکر شده تا به امروز برخی سویه‌های /سینتوباکتر بومانی به تمامی آنتی‌بیوتیک‌های رایج مورد استفاده مقاوم شده است که این امر درمان این عفونت‌ها را بسیار محدود می‌کند. تنها آنتی‌بیوتیک موثر قابل استفاده در درمان عفونت‌های مرتبط با این باکتری کولیسستین می‌باشد که مقاومت به آن هم در حال افزایش است. بطور کلی یافته‌های مطالعه حاضر نشان‌دهنده افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به مطالعات گذشته است. این شیوع بالای مقاومت در نتیجه تجویز غیر ضروری آنتی‌بیوتیک‌ها و عدم بهره‌گیری از ابزارهای مناسب کنترل عفونت است. این موضوع اهمیت بسیاری در شناسایی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی دارد. علاوه بر این انتخاب آنتی‌بیوتیک‌های مناسب بر اساس آنتی‌بیوگرام نقش مهمی در درمان و جلوگیری از گسترش مقاومت دارویی دارد.

نتیجه‌گیری

نتایج نشان‌دهنده درصد بالای فراوانی ژن *mox* است که با مقاومت آنتی‌بیوتیکی رابطه مستقیم دارد، با این حال حضور این ژنها و رابطه آن‌ها با میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی نیاز به بررسی بیشتری دارد. مقاومت بالای /سینتوباکتر بومانی به آنتی‌بیوتیک‌ها بسیار نگران‌کننده بود زیرا کنترل و درمان این باکتری را مشکل می‌سازد. تنها آنتی‌بیوتیک موثر قابل استفاده در درمان

of diagnostic microbiology-e-book: Elsevier Health Sciences; 2018.

10. Buchanan RE, Gibbons NE. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th, editor Baltimore: Williams & Wilkins; 1974. 850 p.

11. Weinstein MP, Limbago B, Patel J, Mathers A, Campeau S, Mazzulli T, et al. M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI; 2018.

12. Pérez-Pérez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. J Clin Microbiol. 2002;40(6):2153-62.

13. Mirzaei E, Doust RH, Mirnejad R, Haghighat S, Rabiee HR. Frequency of blaKPC and blaNDM Genes among *Acinetobacter baumannii* by Molecular Method of PCR. Iran J Infect Dis Trop Med. 2015;19(67):61.-

14. Mahmoudi H, Zare Fahim N, Alikhani MY, Shokoohizadeh L. Investigation of Antimicrobial Effect of Berberine on Ciprofloxacin and Imipenem Resistance *Acinetobacter baumannii* Isolated from Hamadan Hospitals. Iarn J Med Microbiol. 2020;14(1):44-54.

15. Ebrahimi M, Khansari-nejad B, Ghaznavi-Rad E. High frequency of ventilator associated pneumonia nosocomial co-infection Causedby methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and Carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* in intensive care unit. Iarn J Med Microbiol. 2015;1:67-71.

16. El-Saed A, Balkhy HH, Al-Dorzi HM, Khan R, Rishu AH, Arabi YM. *Acinetobacter* is the most common pathogen associated with late-onset and recurrent ventilator-associated pneumonia in an adult intensive care unit in Saudi Arabia. Int J Infect Dis. 2013;17(9):e696-e701.

17. Safari M, Nejad ASM, Bahador A, Jafari R, Alikhani MY. Prevalence of ESBL and MBL encoding genes in *Acinetobacter baumannii* strains isolated from patients of intensive care units (ICU). Saudi J Biol Sci. 2015;22(4):424-9.

18. Vahdani P, Yaghoubi T, Aminzadeh Z. Hospital acquired antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* infections in a 400-bed hospital in Tehran, Iran. Int J Prev Med. 2011;2(3):127.

19. Karimi F, Amini K, Javadi G. A Phenotypic and Genotypic Study of Colistin *arn* Resistance Regulator Gene Classes in *Acinetobacter Baumannii* isolated from Clinical Cases using Multiplex PCR. Biol J Microorganism. 2020.

20. Karbasizade V, Heidari L. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumannii* isolated from Intensive Care Units of Isfahan hospitals, Iran. J Isfahan Med School. 2012;30(191).

21. Rahimi N, Honarmand Jahromy S, Zare Karizi S. Evaluation of Antibiotic Resistance Pattern of Meropenem and Piperacillin-Tazobactam in Multi Drug Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates by

Flow Cytometry Method. Iran J Med Microbiol. 2019;13(3):194-209.

22. Sarafan Sadeghi A, Ansari N, Khademi F, Mir Nejad R, Zamanzad B. Drug Resistance Patterns and Genotyping of *Acinetobacter baumannii* Strains Isolated from Patients Admitted to Shahrekord Teaching Hospitals Using REP-PCR. J Ardabil Univ Med Sci. 2019;19(1).

23. Wang X, Xu X, Li Z, Chen H, Wang Q, Yang P, et al. An outbreak of a nosocomial NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST147 at a teaching hospital in mainland China. Microb Drug Resist. 2014;20(2):144-9.

24. Smolyakov R, Borer A, Riesenberger K, Schlaeffer F, Alkan M, Porath A, et al. Nosocomial multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* bloodstream infection: risk factors and outcome with ampicillin-sulbactam treatment. J Hosp Infect. 2003;54(1):32-8.