



بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و فراوانی ژن های *blaVIM* و *blaNDM* در اسیتوباکتر بومانی‌های ایزوله شده از بیماران بستری شهرهای اصفهان و شهرکرد

مهرداد محمدی: دانشجوی دکترای تخصصی باکتری شناسی پزشکی، گروه میکروبی شناسی و ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران (*نویسنده مسئول) mohammadi-m@kaums.ac.ir

نیکو بهرامی: کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه بیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، فہواز، ایران
جمشید فقری: دانشیار میکروبی شناسی پزشکی، گروه میکروبی و ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

چکیده

کلیدواژه‌ها

اسیتوباکتر بومانی،
بتالاکتامازهای وسیع الطیف،
مقاومت آنتی بیوتیکی،
VIM،
NDM،
PCR

زمینه و هدف: در حال حاضر بتالاکتام‌ها به عنوان داروی انتخابی در درمان عفونت‌های اسیتوباکتر بومانی مقاوم به چند دارو استفاده می‌گردد، هرچند مقاومت به این عوامل رو به افزایش می‌باشد. این باکتری با مکانیسم‌های مختلف از جمله تولید بتالاکتامازها به این داروها مقاومت نشان می‌دهند. متالونبتالاکتاماز دارای تیپ‌های مختلفی می‌باشند که غالباً پلاسمیدی بوده و در بین آن‌ها *blaVIM* و *blaNDM* از همه بارزتر هستند. این مطالعه با هدف بررسی مقاومت دارویی و فراوانی ژن‌های *blaVIM* و *blaNDM* در اسیتوباکتر بومانی‌های ایزوله شده از بیماران شهرهای اصفهان و شهرکرد به روش مولکولی اجرا گردید.

روش کار: این مطالعه مقطعی بر روی ۵۰۰ نمونه بالینی اعم از خون، زخم، ادرار و مجاری تنفسی جمع آوری شده از ۳ بیمارستان شهرهای اصفهان (الزهر و کاشانی) و شهرکرد (کاشانی) طی مدت یک سال از فروردین ۱۳۹۷ تا فروردین ۱۳۹۸ انجام گردید. پس از جمع‌آوری نمونه‌ها با استفاده از روش‌های کشت و بیوشیمیایی گونه/اسیتوباکتر بومانی شناسایی گردید. سپس تست حساسیت آنتی بیوتیکی بر روی این ایزوله‌ها با روش دیسک دیفیوژن بر اساس دستور CLSI انجام گردید. در نهایت برای بررسی فراوانی ژن‌های *blaVIM* و *blaNDM* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی PCR انجام شد.

یافته‌ها: مقاومت آنتی بیوتیکی در ۱۰۰ ایزوله/اسیتوباکتر بومانی به ترتیب مربوط به آنتی بیوتیک‌های سفی پیم (۹۷٪)، سفترایکسون (۹۵٪)، آمیکاسین (۹۵٪)، ایمی پنم (۷۶٪)، پپراسیلین-تازوباکتام (۷۰٪)، مروپنم (۶۹٪)، جنتامایسین (۶۳٪)، توبرامایسین (۵۶٪)، تراسایکلین (۵۱٪)، آمپی سیلین-سولباکتام (۴۹٪) و کمترین مقاومت مربوط به پلی میکسین B به دست آمد. نتایج PCR نشان داد که به ترتیب ۱۷٪ و ۲۰٪ سویه‌ها حامل ژن‌های *blaVIM* و *blaNDM* می‌باشند.

نتیجه‌گیری: افزایش میزان شیوع بیمارستانی اسیتوباکتر بومانی، لزوم طراحی برنامه‌های حفاظتی نظیر کنترل عفونت‌های ایجاد شده در بخش مراقبت‌های ویژه را خاطر نشان می‌کند. همچنین با استفاده از روش‌های مولکولی می‌توان این باکتری‌ها را شناسایی و ویژگی مقاومت آنتی بیوتیکی آن‌ها را تعیین کرد و متناسب با آن آنتی بیوتیک‌ها را تجویز نمود.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت کننده: دانشگاه علوم پزشکی زاهدان

شیوه استناد به این مقاله:

Mohammadi M, Bahrami N, Faghri J. The Evaluation of Antibiotic Resistance Pattern and Frequency of *blaVIM* and *blaNDM* Genes in Isolated *Acinetobacter baumannii* from Hospitalized Patients in Isfahan and Shahrekord. Razi J Med Sci. 2020;27(4):143-156.

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



Original Article

The evaluation of antibiotic resistance pattern and frequency of *bla*_{VIM} and *bla*_{NDM} genes in isolated *Acinetobacter baumannii* from hospitalized patients in Isfahan and Shahrekord

- ① **Mehrdad Mohammadi**, PhD Student of Medical Bacteriology, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran (*Corresponding author) mohammadi-m@kaums.ac.ir
Nikou Bahrami, MSc of Microbiology, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran
Jamshid Faghri, Associate Professor, Department of Bacteriology and Virology, school of medicine, Esfahan University of medical science, Isfahan, Iran

Abstract

Background: *Acinetobacter baumannii* has emerged as an opportunistic nosocomial pathogen that causes ventilator-associated pneumonia, bacteraemia, endocarditis, wound infections, meningitis and urinary tract infections in patients with serious underlying disease and immunocompromised patients, and in those undergoing prolonged hospitalization and surgical procedures involving long-term antimicrobial therapy. The majority of nosocomial *A. baumannii* isolates are resistant to different classes of antibiotic including cephalosporin's, penicillin's, carbapenem's, fluoroquinolones and aminoglycosides. Multidrug-resistant (MDR) *A. baumannii* isolates are a serious problem in healthcare settings worldwide, especially in Europe, Asia, Latin America and other areas. The majority of MDR strains have been isolated from adults attending intensive healthcare units and are associated with increased patient mortality and persistence of isolates in the hospital environment. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes is thought to play a major role in the emergence and development of MDR strains. Treatment of infections caused by highly resistant isolates, especially MDR, XDR (extensively drug resistant) and PDR (pan drug resistant), can be difficult. Currently, beta-lactams are used as a selective drug in the treatment of multi-drug resistant *Acinetobacter* spp., although resistance to these agents is increasing. Metallo-beta-lactamases have different types that are often plasmid and among them *bla*_{VIM} and *bla*_{NDM} are the most prominent. The aim of this study was to evaluate the drug resistance and the frequency of *bla*_{VIM} and *bla*_{NDM} genes in isolated isolates from Isfahan and Shahrekord cities by molecular methods.

Methods: This cross-sectional study was performed on 500 clinical specimens including blood, ulcer, urine and respiratory tract collected from 3 hospitals in Isfahan (Alzahra and Kashani) and Shahrekord (Kashani) during one year from April 2018 to April 2019. After assembling samples, biochemical methods of *Acinetobacter* spp were identified. Susceptibility of isolates to the following antibiotics was examined using the disk diffusion method according to the Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines. Multidrug resistance (MDR) was defined as resistance to at least one agent in three or more antimicrobial categories. The antimicrobial susceptibility test of the isolated organisms was completed by the disc diffusion method using the Kirby-Bauer technique. According to the recommendation of CLSI, all tests were performed on Mueller Hinton agar. The surface was lightly and uniformly inoculated by a cotton swab. Prior to inoculation, the swab stick was dipped into a bacterial suspension having visually equivalent turbidity to 0.5 McFarland standards. The swab stick was then taken out and squeezed on the wall of the test tube to discard extra suspension. Inoculated

Keywords

Acinetobacter baumannii,
Extended Spectrum Beta-lactamases,
Antibiotic resistance,
VIM,
NDM,
PCR

Received: 18/04/2020

Published: 27/06/2020

plates were incubated at 35°C for 24 h. On the next day, plates were read by taking measurements of zone of inhibition. Finally, DNA extraction from overnight cultures of *A. baumannii* isolates was performed according to the protocol provided with the QIAGEN DNA Mini kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA). PCR primers were used to determine the frequency of *bla*_{VIM} and *bla*_{NDM} genes. The data were analyzed with SPSS version 17.0 software (SPSS, Inc., Chicago, IL). A chi-square test was used to determine the statistical significance of the data. A $p < 0.05$ was considered significant.

Results: Antibiotic resistance in 100 isolates of *A. baumannii* was related to antibiotics: Cefimide (97%), Ceftriaxone (95%), Amikacin (95%), Imipenem (76%), Piperacillin-tazobactam (70%), Meropenem (69%), Gentamicin (63%), Tobramycin (56%), Tetracycline (51%), and Ampicillin-Sulbactam (49%) and lowest resistance to Poly-Mixin B were obtained. The PCR results showed 17 and 20%, of strains carrying *bla*_{VIM} and *bla*_{NDM} genes, respectively.

The prevalence rate of *bla*_{NDM} in this study was 20%, which is contrary to studies conducted by Tognim et al. In 2011 (55%) which show that the prevalence rate of *bla*_{NDM} has been decreasing over time. This decrease can be seen in the prevalence of *bla*_{VIM}.

Conclusion: Increase in the incidence of *A. baumannii* in hospital points to the need to design protective programs such as controlling infections in the intensive care unit. Also, using molecular methods, these bacteria can be identified and their antibiotic resistance characteristics are determined and appropriate antibiotics are prescribed.

Conflicts of interest: None

Funding: Zahedan University of Medical Sciences

Cite this article as:

Mohammadi M, Bahrami N, Faghri J. The Evaluation of Antibiotic Resistance Pattern and Frequency of *bla*_{VIM} and *bla*_{NDM} Genes in Isolated *Acinetobacter baumannii* from Hospitalized Patients in Isfahan and Shahrekord. Razi J Med Sci. 2020;27(4):143-156.

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

مقدمه

تنظیم کردن مکانیسم‌های مقاومت ذاتی و اکتساب عوامل تعیین کننده خارجی مهارت‌های اساسی بود که *اسیتوباکتر* را به یک ارگانیسم با اهمیت تبدیل کرد (۱). سویه‌های *اسیتوباکتر بومانی* در پتانسیل‌های اپیدمیولوژی شان تفاوت‌های زیادی دارند و آن سویه‌هایی که به صورت وسیع و سریعی بین بیمارستان‌ها گسترش می یابند به عنوان سویه‌های اپیدمیک *اسیتوباکتر بومانی* در نظر گرفته می‌شوند و در حقیقت مقاومت آنتی بیوتیکی یکی از علل گسترش بیمارستانی این سویه‌های باکتریایی می‌باشد (۲). انتخاب آنتی بیوتیک‌ها برای درمان تجربی هنوز هم مورد بحث قرار دارد و باید بر پایه آخرین میزان حساسیت اعلام شده توسط موسسات تجویز گردد (۳و۴). با وجود تنوع ایجاد کننده عوامل مقاومت در *اسیتوباکتر بومانی*، درمان باید بر پایه انجام تست های حساسیت آنتی بیوتیکی مناسب انجام بگیرد (۴). کارباپنم دارویی است که بر ضد طیف وسیعی از سویه‌های *اسیتوباکتر بومانی* که در سطح جهان گسترده است نیز فعال می‌باشد و برای درمان جدی عفونت‌های ایجاد شده توسط این باکتری مورد استفاده قرار می‌گیرد (۵و۶).

اسیتوباکتر بومانی از پاتوژن‌های فرصت طلب در حال گسترش بوده، این باکتری یک باسیل گرم منفی، غیر متحرک، غیر تخمیری، پلی مورف، هوازی اجباری و معمولا کپسول دار است که بر روی محیط‌های معمولی آزمایشگاهی به آسانی رشد می‌کند (۲و۷). اندازه کلنی بین ۱ تا ۲ میلی متر، بدون پیگمان و صاف تا موکوئیدی است (۷). در مرحله رشد لگاریتمی شکل باسیل دارند، ولی در مرحله سکون به صورت کوکوباسیل دیده می‌شوند *اسیتوباکتر بومانی* اکسیداز منفی هستند، توانایی احیای نیترات را ندارند، همچنین اندول منفی و کاتالاز مثبت می‌باشند. بر روی محیط آگار خون دار معمولاً همولیز ایجاد می‌کنند و در دمای ۴۴ درجه سانتی گراد رشد می‌کنند (۷).

این باکتری‌ها در روی سطوح خشک تا مدت‌ها زنده باقی می‌مانند (۷). مقاومت بالای این باکتری نسبت به شرایط محیطی (۱۱ روز در رطوبت نسبی ۳۱ درصد، ۴ روز در رطوبت نسبی ۱۰ درصد) امکان حضور این

باکتری را در محیط‌های بیمارستانی افزایش داده است (۷و۸). این ارگانیسم به عنوان فلور نرمال در پوست و دستگاه تنفسی افراد سالم وجود داشته و در سال‌های اخیر به عنوان یک عامل مهم در عفونت‌های بیمارستانی گزارش شده است (۸). با وجود اینکه این باکتری معمولاً از ویرولانسی پائینی برخوردار است، اما می‌تواند طیف وسیعی از عفونت‌ها نظیر باکتریمی، سپتی سمی و پنومونی همچنین عفونت خون در بیماران دچار سوختگی با ضعف سیستم ایمنی را ایجاد نماید (۹). *اسیتوباکتر بومانی* بیشترین عامل ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی به ویژه در بخش مراقبت‌های ویژه می‌باشند که نسبت به طیف وسیعی از آنتی بیوتیک‌ها مقاومت نشان می‌دهند (۷و۹). اگرچه سویه‌های *اسیتوباکتر بومانی* معمولاً در آب و خاک یافت می‌شوند، ولی منشا سویه‌های اپیدمیک مقاومت به چند دارویی آن از بیمارستان می‌باشد و این سویه‌ها از لحاظ ژنتیکی بسیار شبیه هم هستند. ریسک فاکتورهای مهم آن مصرف طولانی مدت آنتی بیوتیک، اقامت طولانی در بخش مراقبت‌های ویژه (ICU) و بیماری‌های جدی می‌باشد (۱۰).

اسیتوباکتر بومانی به عوامل ضد میکروبی بسیار مقاوم است که این مقاومت می‌تواند ذاتی و یا از طریق به دست آوردن عوامل ژنتیکی مقاومت باشد (۵). درمان عفونت‌های *اسیتوباکتر* اغلب در مواردی که فنوتیپ مقاومت، چند دارویی است مشکل می‌باشد (۷و۱۱). این مقاومت‌ها اغلب با واسطه ژن‌هایی صورت می‌گیرد که بر روی عناصر ژنتیکی متحرک مثل ترانسپوزون‌ها و اینتگرون‌ها قرار داشته و به سادگی در میان باکتری‌ها انتشار می‌یابند. در حال حاضر بتالاکتام‌ها به عنوان داروی انتخابی در درمان عفونت‌های *اسیتوباکتر بومانی* مقاوم به چند دارو استفاده می‌گردد، هرچند مقاومت به این عوامل رو به افزایش می‌باشد (۱۱و۱۲).

این باکتری با مکانیسم‌های مختلف به این داروها مقاومت نشان می‌دهند که می‌توان به موارد زیر اشاره کرد (۶). یکی از این عوامل ایجاد کننده مقاومت تولید متالوبتالاکتاماز می‌باشد (۵و۶). بتالاکتامازهای وسیع الطیف (Extended Spectrum Beta-lactamases-) ESBL بتالاکتامازهای دسته‌ی مولکولی A هستند که قابل انتقال از یک سویه به سویه دیگر و یا مابین

بیمارستان‌های شهرهای اصفهان (الزهرا (س) و آیت الله کاشانی) و شهرکرد (آیت الله کاشانی) جمع آوری شدند و سپس به آزمایشگاه مرکزی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان منتقل گردید.

نمونه‌های مورد بررسی شامل نمونه‌های جمع آوری شده از خون، زخم، ادرار، تراشه و ... بودند. این نمونه‌ها از بیمارانی که حداقل به مدت سه روز در این بیمارستان‌ها بستری شده بودند و عفونت را در محیط بیمارستان کسب کرده بودند جمع آوری شد.

جداسازی و شناسایی ایزوله‌های اسیتوباکتر: محیط BHI برات حاوی نمونه به محیط آزمایشگاه انتقال داده و سپس هر نمونه روی محیط‌های بلادگار و مک کانکی آگار کشت داده شدند (۷). سپس کشت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه داری شدند. پس از ۲۴ ساعت، تمام کشت‌ها به محیط نوترینت آگار منتقل شدند و مجدد به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه داری شدند. پس از شناسایی و جداسازی باکتری‌ها، نمونه‌ها با افزودن ۵۰٪ گلیسرول استریل در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تعیین حساسیت ضد میکروبی (آنتی بیوگرام): مقاومت دارویی سویه‌های جدا شده نسبت به آنتی بیوتیک‌های سفی‌پیم (۳۰ میکروگرم)، سفتریاکسون (۳۰ میکروگرم)، آمیکاسین (۳۰ میکروگرم)، ایمپنم (۱۰ میکروگرم)، مروپنم (۱۰ میکروگرم)، توبرامایسین (۱۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۲ میکروگرم)، پپراسیلین-تازوباکتام (۱۱۰ میکروگرم)، آمپی‌سیلین-سولباکتام (۲۰ میکروگرم)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، و پلی میکسین B (۳۰۰ میکروگرم) (از شرکت Mast آمریکا) بر اساس الگوهای استاندارد CLSI 2016 به روش انتشار دیسک در آگار (Disc Diffusion) انجام گردید. جهت کنترل کیفی از سویه اشریشیا کلی ATCC 25922 استفاده گردید.

شنایابی ژن‌های blaNDM و blaVIM در ایزوله‌های اسیتوباکتر: استخراج ژنوم مطابق دستورالعمل کیت استخراج شرکت Bioneer کره جنوبی انجام شد. در این مطالعه DNA کروموزومی ۱۰۰ ایزوله مورد مطالعه توسط کیت استخراج شد. به منظور اطمینان از حضور DNA و همچنین غلظت و کیفیت نسبی آن، از

گونه‌های باکتریایی می‌باشند. تعداد اندکی از ESBL ها هم در زیر گروه 2be و 2d قرار می‌گیرند (۱۱ و ۱۲).

بر اساس مطالعه هانگ و همکارانش از ۵۷ بیمارستان به نمایندگی از ۱۸ استان در چین، در مجموع ۱۱۲۹۸ نمونه بالینی، ۱۹ اسیتوباکتر حاوی ژن blaNDM جدا شده از ۴ استان مختلف از چین شناسایی شده که تمام به کارباینها و سفالوسپورین‌ها مقاوم بودند (۱۳).

آروحوموکاما به بررسی و تشریح مولکولی ژن blaNDM در اسیتوباکتر بومانی در ایزوله‌های جداسازی شده از بیمارستان آلمان پرداختند. کارهای انجام شده در این مطالعه حاکی از وجود ایزوله‌های اسیتوباکتر بومانی مقاوم به چند دارو حاوی ژن بتالاکتاماز blaNDM می‌باشد (۱۴).

در مطالعه شاهچراغی و همکارانش، در بررسی ۱۰۰ نمونه اسیتوباکتر مقاوم به ایمپنم جمع آوری شده از بیمارستان‌های تهران، شش نمونه جداسازی شده از نوع متالوبتالاکتاماز و ۹۴ نمونه جداسازی شده از OXA کارباینمازها می‌باشد. ژن‌های blaSPM-1، blaGES-1، blaOXA، blaOXA-23 توسط PCR در میان ۶ و ۲ و ۹۴ و ۸۴ ایزوله‌های اسیتوباکتر بومانی جداسازی شده است. تولید آنزیم‌های بتالاکتامازی GES-1 و OXA-51 و OXA-21 و SPM و VIM و NDM به عنوان تهدید در حال ظهور در میان اسیتوباکتر بومانی در ایران است (۱۵).

در تحقیقات به عمل آمده در ایران، به صورت کاملاً اختصاصی به حضور ژن‌های blaVIM و blaNDM کمتر اشاره شده است، بنابراین ضروری است که برای شناسایی دقیق این نوع مقاومت از روش‌های مولکولی در کنار روش‌های فنوتیپی استفاده کنیم. هدف این پژوهش تعیین میزان مقاومت دارویی و میزان شیوع ژن‌های blaVIM و blaNDM در سویه‌های اسیتوباکتر بومانی ایزوله شده از بیماران شهرهای اصفهان و شهرکرد در سال ۱۳۹۷ تا ۱۳۹۸ با روش مولکولی PCR می‌باشد.

روش کار

جمع آوری نمونه: مطالعه حاضر با کد اخلاق ۹۷۱۰۱۰۱ از بهمن سال ۱۳۹۷ تا خرداد ماه سال ۱۳۹۸، ۵۰۰ نمونه طی مدت یک سال از

را به ۲۵ میکرولیتر رسانده که در جدول ۲ نشان داده شده است. برای بررسی ژن های VIM و NDM برنامه آزمایش PCR مطابق جداول ۳ و ۴ می باشد. محصولات PCR را بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ با بافر TBE (Tris-borate EDTA) الکتروفورز شده و سپس ژل را با محلول DNA safe stain سینا ژن رنگ گردید. پس از پایان الکتروفورز، ژل با دستگاه Gel doc و در طول موج ۲۸۰ نانومتر از نظر وجود باندهای هدف در کنار مارکر مولکولی و کنترل مثبت و منفی مورد بررسی قرار گرفت.

الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد. اجرای PCR: از مستر میکس محصول شرکت Ampliqon III (ایالات متحده آمریکا Cat. No.: A180301) استفاده شد. توالی پرایمرهای استفاده شده در جدول ۱ نشان داده شده است. نمونه پسودوموناس آئروژینوزا ۲۷۸۵۳ که دارای ژن های bla_{VIM} و bla_{NDM} نمی باشند به عنوان کنترل منفی استفاده شد. از سویه *K. pneumoniae* ATCC 1706 تولید کننده متالوبتالاکتاماز تیپ VIM و NDM به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. برای انجام آزمایش PCR حجم نهایی هر میکروتیوپ

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده

Primer	Nucleotide sequence(5' to 3')	Product size (bp)	منبع
VIM-F	5'-ATT-GGT-CTA-TTT-GAC-CGC-GTC-3'	۵۱۴	(۱۳)
VIM-R	5'-AAT-GCG-CAG-CAC-CAG-GAT-AG-3'		
NDM-F	5'-GGT-TTG-GCG-ATC-TGG-TTT-TC-3'	۶۲۱	(۱۴)
NDM-R	5'-CGG-AAT-GGC-TCA-TCA-CGA-TC-3'		

جدول ۲- ترکیب واکنش PCR برای هرایزوله

مواد لازم برای واکنش	حجم اضافه شده
Distilled water	۱۳ میکرولیتر
PCR Master Mix	۹ میکرولیتر
Primer(F&R)	۱ میکرولیتر
	۲۰ پیکومول
DNA	۲ میکرولیتر
	نانوگرم بر میلی لیتر (۲۰-۱۰)
Total Volume	۲۵ میکرولیتر

جدول ۳- برنامه انجام واکنش PCR برای ژن VIM

Program	Temperature °c	Time	Cycles
Initial	۹۵	۵ دقیقه	۱
Denaturation			
Denaturation	۹۴	۶۰ ثانیه	۳۰
Annealing	۵۵	۶۰ ثانیه	
Extension	۷۲	۶۰ ثانیه	
Final Extension	۷۲	۱۰ دقیقه	۱

جدول ۴- برنامه انجام واکنش PCR برای ژن NDM

Program	Temperature °c	Time	Cycles
Initial Denaturation	۹۴	۱۰ دقیقه	۱
Denaturation	۹۴	۳۰ ثانیه	۳۶
Annealing	۵۲	۴۰ ثانیه	
Extension	۷۲	۵۰ ثانیه	
Final Extension	۷۲	۵ دقیقه	۱

یافته‌ها

بومانی نسبت به ۳ یا بیش از ۳ آنتی بیوتیک مقاوم هستند. همچنین در این مطالعه مشخص گردید که هیچ سویه‌ای از اسینتوباکتر بومانی مقاوم به همه آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم نشده و آنتی بیوتیکی وجود دارد که بر روی آن موثر باشد.

پس از تهیه الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی برای هر نمونه می‌توان نمونه‌ها را بر اساس الگوهای مشخص طبقه بندی کرد که در جدول ۶ آورده شده است.

بر طبق جدول ۶ ۳۱ الگوی مقاومت دارویی برای ۱۰۰ نمونه به دست آمد و در هیچ یک از نمونه‌ها، مقاومت کامل آنتی بیوتیکی مشاهده نشد.

نتایج به دست آمده در بررسی ژن کد کننده آنزیم bla_{VIM} با استفاده از یک جفت پرایمر VIM-R و VIM-F و انجام PCR وجود یا عدم وجود ژن bla_{VIM} در نمونه‌های جدا شده مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱). نتایج PCR جهت شناسایی سویه‌های حاوی ژن bla_{VIM} نشان داد که ۱۷ مورد (۱۷٪) از ایزوله‌ها دارای ژن bla_{VIM} بودند.

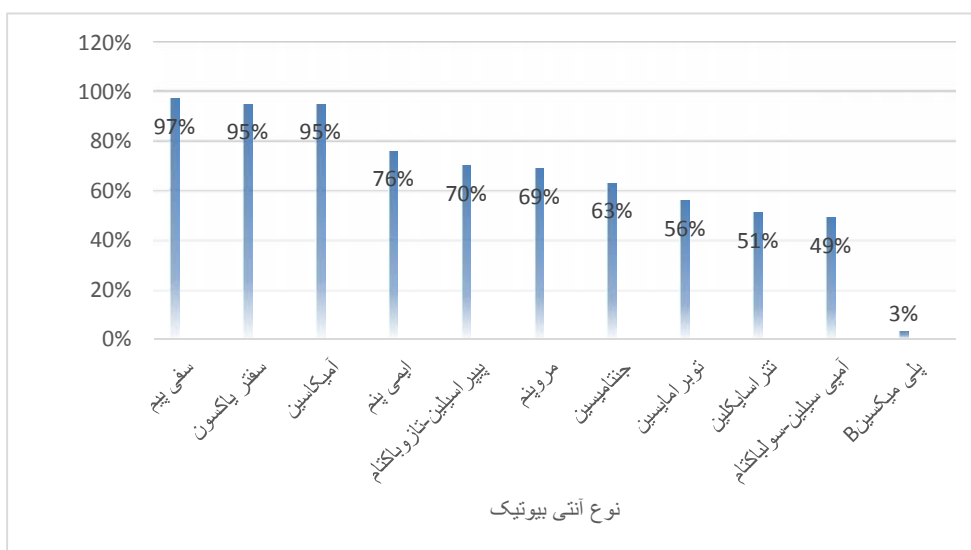
در این بررسی از ۵۰۰ نمونه بیماران بستری، ۱۰۰ ایزوله (۲۰٪) با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی شناسایی اولیه صورت گرفته و همچنین توسط حضور ژن bla-OXA51 به وسیله PCR به عنوان اسینتوباکتر بومانی تعیین هویت شدند. ۴۰ نمونه از بخش مراقبت‌های ویژه ۳۰ نمونه از بخش عفونی، ۲۰ نمونه از اورژانس و ۱۰ نمونه از سایر بخش‌های ایزوله شد. نتایج بررسی نشان داد که ۴۰ نمونه خون (۴۰٪)، ۲۷ نمونه تراشه (۲۷٪)، ۱۲ نمونه زخم (۱۲٪)، ۲۱ نمونه ادرار (۲۱٪) ایزوله گردید.

نتایج تست‌های افتراقی برای گونه‌های اسینتوباکتر بومانی: خصوصیات اسینتوباکتر به صورت جدول ۵ بود. نتایج حاصل از روش دیسک دیفیوژن برای تمام ایزوله‌های اسینتوباکتر بومانی: نتایج حاصل آنتی بیوگرام بر اساس مقاوم (R)، نیمه حساس (I)، حساس (S) مشخص شد. که در نمودار ۱ آورده شده است.

بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله‌های اسینتوباکتر بومانی به ترتیب مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های سفی‌پیم، سفتریاکسون و آمیکاسین و کم‌ترین مقاومت مربوط به پلی میکسین B به دست آمد. نتایج این مطالعه نشان داد که ۷۰٪ ایزوله‌های اسینتوباکتر

جدول ۵- خصوصیات بیوشیمیایی اسینتوباکتر بومانی

H2S	VP	MR	اندول	تخمیر	حرکت	سیترات	OF	TSI	اوره آز	اکسیداز	کاتالاز
-	-	-	-	-	-	+	+	K/K	-	-	+



نمودار ۱- درصد مقاومت مشاهده شده در بین ایزوله‌های جدا شده از بیماران

جدول ۶- الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در *اسیتوباکتر بومانی*

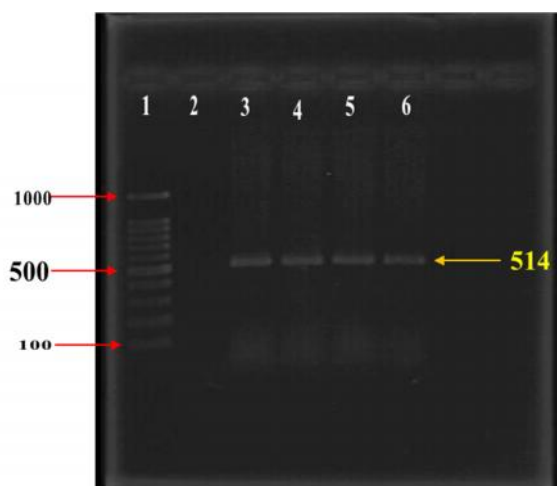
نمونه‌های مقاوم به یک تا ده آنتی بیوتیک	مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها	تعداد در هر الگو	تعداد کل
۱	TE	۵	۲۰
	AK	۱۵	
۲	CP,CRO	۱۰	۱۰
۴	PB,CP,MEM,AK	۴	۱۰
	IMI,CRO,CP,AK	۵	
	CRO,PTZ,CP,MEM	۱	
۵	IMI,CRO,PTZ,MEM,AK	۳	۷
	IMI,CRO,CP,AK,SAM	۲	
	CRO,GM,CP,TE,AK	۱	
	CRO,PTZ,CP,TE,AK	۱	
۶	IMI,CRO,PTZ,CP,MEM,AK	۴	۱۰
	IMI,CRO,PTZ,CP,TE,AK	۲	
	IMI,PTZ,CP,MEM,AK,SAM	۲	
	PB,CRO,PTZ,CP,MEM,AK	۲	
۷	CRO,PTZ,GM,CP,TE,AK,TOB	۱	۷
	TOB,CRO,PTZ,GM,CP,MEM,AK	۱	
	IMI,CRO,PTZ,CP,MEM,AK,SAM	۲	
	TOB,CRO,PTZ,CP,MEM,AK,SAM	۱	
	IMI,CRO,GM,CP,TE,AK,SAM	۱	
	IMI,CRO,PTZ,GM,CP,MEM,AK	۱	
۸	IMI,TOB,CRO,PTZ,CP,MEM,AK,SAM	۶	۱۷
	IMI,TOB,CRO,GM,CP,MEM,AK,TE	۱	
	IMI,TOB,CRO,PTZ,CP,MEM,AK,GM	۴	
	TE,TOB,CRO,PTZ,CP,MEM,AK,GM	۴	
	IMI,CRO,PTZ,CP,MEM,AK,GM,TE	۱	
	IMI,CRO,PTZ,CP,MEM,AK,SAM,TE	۱	
۹	IMI,TOB,CRO,PTZ,GM,CP,TE,MEM,AK	۸	۱۲
	IMI,TOB,CRO,GM,CP,TE,MEM,AK,SAM	۲	
	IMI,TOB,CRO,PTZ,CP,TE,MEM,AK,SAM	۲	
۱۰	IMI,TOB,CRO,PTZ,GM,CP,TE,MEM,AK,SAM	۷	۷
۱۱	مقاومت به تمام آنتی بیوتیک‌ها	۰	۰
جمع کل	۲۹	۱۰۰	۱۰۰

سفی پیم = CP، تتراسایکلین = TE، مرونیم = MEM، آمیکاسین = AK، آمپی سیلین - سولباکتام = SAM، پلی میکسین B = PB، سفتریاکسون = CRO، پیراسیلین - تازوباکتام = PTZ، جنتامایسین = GM، ایمی پنم = IMI، تورامایسین = TOB.

ژن *bla_{NDM}* بودند. بنابراین ۱۷٪ نمونه‌های مورد بررسی حاوی ژن‌های کدکننده آنزیم‌های بتالاکتاماز VIM و ۲۰٪ نمونه‌های مورد بررسی حاوی ژن‌های کدکننده آنزیم‌های بتالاکتاماز NDM بودند که به صورت نمودار ۲ قابل مشاهده است.

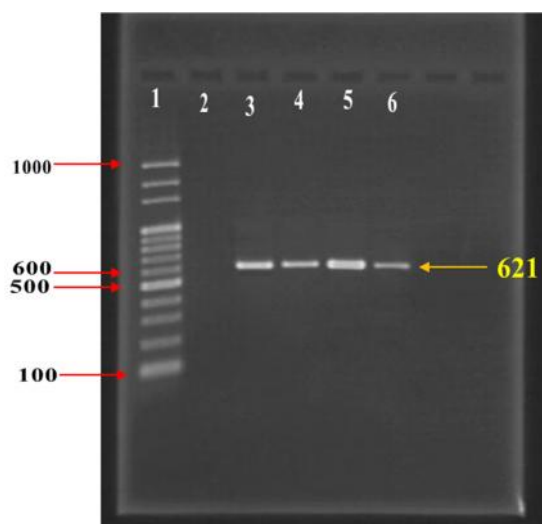
نتایج به دست آمده در بررسی ژن کدکننده آنزیم *bla_{NDM}* با استفاده از یک جفت پرایمر NDM-R و NDM-F و انجام PCR وجود یا عدم وجود ژن *bla_{NDM}* در نمونه‌های جدا شده مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۲).

نتایج PCR جهت شناسایی سویه‌های حاوی ژن *bla_{NDM}* نشان داد که ۲۰ مورد (۲۰٪) از ایزوله‌ها دارای



شکل ۱- الکتروفورز ژل آگارز محصول آمپلی فایل شده ی ژن blaVIM در سویه های اسیتوباکتر بومانی با PCR

ستون ۱: مارکر (100bp DNA ladder)
ستون ۲: محصول آمپلی فای شده ایزوله شده فاقد ژن blaVIM از نمونه های بالینی.
ستون ۳: محصول آمپلی فای شده ژن blaVIM (514bp) در سویه استاندارد.
ستون ۴، ۵ و ۶: محصولات آمپلی فای شده از نمونه های بالینی مورد بررسی.

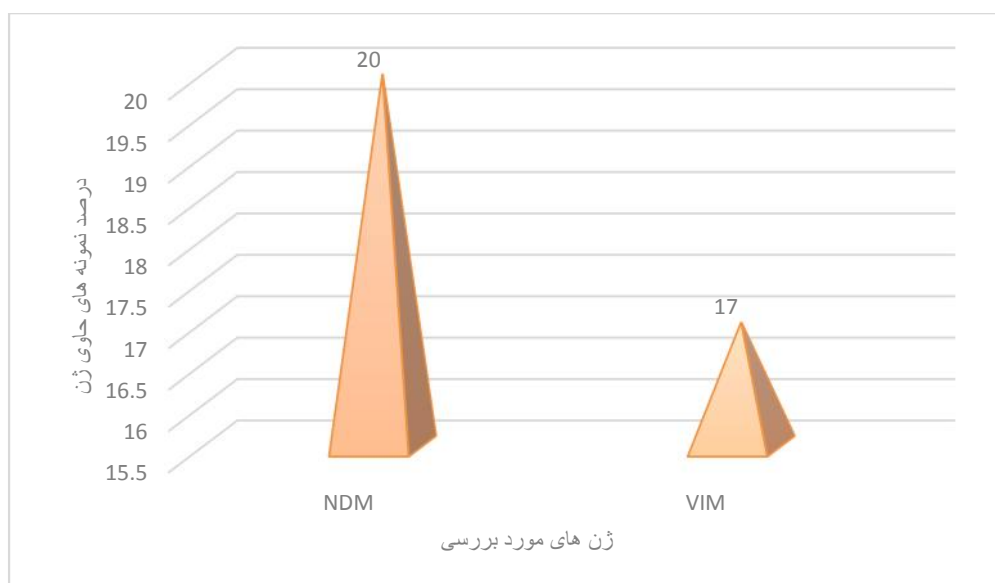


شکل ۲- الکتروفورز ژل آگارز محصول آمپلی فای شده ی ژن blaNDM در سویه های اسیتوباکتر بومانی با PCR.

ستون ۱: مارکر (1000bp DNA ladder)
ستون ۲: محصول آمپلی فای شده ایزوله شده فاقد ژن blaNDM از نمونه های بالینی.
ستون ۳: محصول آمپلی فای شده ژن blaNDM (621bp) در سویه استاندارد.
ستون ۴-۶: محصولات آمپلی فای شده از نمونه های بالینی مورد بررسی.

هیدرولیز طیف وسیعی از بتالاکتام ها از جمله سفتریاکسون (۰.۹۰٪)، سفی پیم (۰.۸۵٪)، و ایمپ پنم و مروپنم (۰.۸۰٪)، بوده و به پلی میکسین B حساس می باشد و قادر به هیدرولیز آزترونام نمی باشند.

در این مطالعه اسیتوباکتر بومانی های دارای ژن blaVIM مقاومت بسیاری بالایی به آنتی بیوتیک های بتالاکتام از جمله سفی پیم (۰.۹۴٪)، سفتریاکسون (۰.۸۲٪)، ایمپ پنم و مروپنم (۰.۷۰٪) نشان داده اند و به پلی میکسین B حساس بوده اند.
اسیتوباکتر بومانی های دارای ژن blaNDM قادر به



نمودار ۲- درصد فراوانی ژن های NDM، VIM مورد مطالعه در اسینتوباکتر بومانی های ایزوله شده از بیماران

درسویه های اسینتوباکتر بومانی جدا شده از نمونه های بالینی به روش فنوتیپی تعیین گردید و در این مطالعه از تکنیک PCR برای بررسی ژن های کد کننده ی آنزیم های bla_{NDM} و bla_{VIM} به عنوان روشی سریع و قابل ارزش برای شناسایی بتالاکتامازها در ایزوله های اسینتوباکتر بومانی استفاده شد که این روش برای تشخیص سریع عفونت های ویژه و کنترل آن ها در بخش های بیمارستان به منظور محدود کردن شیوع بیمارستانی آن ها مفید می باشد. در این تحقیق از ۵۰۰ نمونه بیماران بستری، ۱۰۰ نمونه (۲۰٪) به عنوان اسینتوباکتر بومانی تعیین هویت شدند. نتایج بررسی نشان داد که از نمونه های اسینتوباکتر بومانی ۴۰ نمونه از خون (۴۰٪)، ۲۷ نمونه تراشه (۲۷٪)، ۱۲ نمونه زخم (۱۲٪)، و نمونه ادرار (۲۱٪) ایزوله گردید. ۴۰ نمونه از بخش مراقبت های ویژه، ۳۰ نمونه از بخش عفونی، ۲۰ نمونه از اورژانس و ۱۰ نمونه از سایر بخش های ایزوله شد. بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله های اسینتوباکتر بومانی به ترتیب مربوط به آنتی بیوتیک های: سفی پیم (۹۷٪)، سفتریاکسون (۹۵٪)، آمیکاسین (۹۵٪)، ایمپی پنم (۷۶٪)، پیپراسیلین-تازوباکتام (۷۰٪)، مروپنم (۶۹٪)، جنتامایسین (۶۳٪)، توبرامایسین (۵۶٪)، تتراسایکلین

بحث و نتیجه گیری

اسینتوباکتر بومانی شایع ترین گونه ای است که در سال های اخیر به عنوان یک عامل مهم در عفونت های بیمارستانی گزارش شده است و جداسازی از خون، خلط، مایع جنب، پوست و ادرار صورت پذیرفته است. عفونت اسینتوباکتر به ویژه در بیمارانی که در بخش های مراقبت ویژه بیمارستان ها بستری هستند بسیار خطرناک می باشد (۵-۲). شایع ترین باکتری گروه اسینتوباکتر، اسینتوباکتر بومانی می باشد که به عنوان یکی از علل عمده ی عفونت های اکتسابی بیمارستانی به دلیل میزان بالای مقاومت ضد میکروبی از جمله، پنومونی، سپتی سمی، عفونت های دستگاه ادراری، عفونت زخم و مننژیت شناخته شده است (۶-۳). سویه های اسینتوباکتر بومانی نسبت به تمام آنتی بیوتیک هایی که تاکنون گزارش شده است مقاومت نشان داده است. امروزه مکانیسم های مقاومت در گونه های مختلف اسینتوباکتر به صورت مختلفی بروز می کنند که یکی از آن ها تولید بتالاکتامازهای وسیع الطیف می باشد که توسط ژن های کدکننده ی آنزیم های bla_{NDM} و bla_{VIM} کد می شوند (۸). این مطالعه با هدف تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی و فراوانی سویه های مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف

(۵۱٪)، و آمپی سیلین-سولباکتام (۴۹٪) و کمترین مقاومت مربوط به پلی میکسین B به دست آمد. در این تحقیق ۱۰۰ نمونه (۷۶/۹٪) به عنوان اسیتوباکتر بومانی تعیین هویت شدند که تقریباً مشابه مطالعه کنستانتینو و همکارانش در طی سال ۲۰۱۲ بود که گزارش نمودند از ۲۴ ایزوله های کلینیکی جدا شده، ۷۱٪ اسیتوباکتر بومانی و ۲۹٪ اسیتوباکتر لوفی می باشد که افزایش چند درصدی این گونه ها می تواند به دلیل رعایت نکردن دقیق بهداشت در بخش مراقبت های ویژه باشد (۱۶).

در مطالعه حاضر همانند مطالعه هوجر و همکارانش (۱۷) و بر خلاف بررسی های شاهچراغی و همکارانش (۱۵)، کارلوسکی و همکارانش (۱۸) و کیلیک و همکارانش (۱۹) نشان داده شد که حساسیت به مروپنم و ایمپی پنم در ایزوله های اسیتوباکتر بومانی پائین می باشد و سویه های اسیتوباکتر بومانی به این آنتی بیوتیک ها تا حدود زیادی مقاوم شده اند. عدم تطابق نتایج این بررسی با مطالعات ذکر شده می تواند به دلیل نوع نمونه های مورد بررسی و نوع دیسک آنتی بیوتیکی مصرفی و اجرای آنتی بیوگرام باشد. همچنین می توان گفت که این اختلاف به این دلیل می تواند باشد که مصرف بی رویه این آنتی بیوتیک باعث پیدایش سویه های با مقاومت بالا در این بیمارستان ها شده است.

همچنین در مطالعه سانگ و همکارانش در طی تحقیقی که انجام دادند بیان کردند که عوامل مقاومت به ایمپی پنم در اسیتوباکتر بومانی های جدا شده به دلیل وجود ژن bla_{IMP} و bla_{VIM} می باشد که عامل مقاومت این باکتری ها در مقابل آنتی بیوتیک ها است (۲۰).

این مطالعه همانند مطالعات هو و همکارانش (۲۱) و اسمولیاکوو و همکارانش مشخص گردید که اغلب سویه ها به آمیکاسین، سفنازیدیم، جنتامایسین، ایمپی پنم، مروپنم، سفی پیم، پپیراسیلین-تازوباکتام مقاوم و به پلی میکسین B حساس بودند (۲۲) که کارا و همکارانش در سال ۲۰۱۲ در طی مطالعات شان نشان دادند که افزایش شیوع مقاومت به چند دارو در ایزوله های اسیتوباکتر بومانی در بیمارستان ها، ناشی از ژن bla_{VIM} است که به وسیله PCR شناسایی شده اند

(۲۳).

نتایج این مطالعه همانند نتایج مطالعات جاگی و همکارانش در سال ۲۰۱۲ بر روی اسیتوباکتر بومانی از نمونه های مختلف بالینی در بخش مراقبت های ویژه در هند نشان داد که الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی، شیوع و پتانسیل بیماری زایی حاکی از آن است که بیشتر بیماری زایی ها در مقاومت به کارباپنم یافت شده اند (۲۴).

نتایج آنتی بیوگرام این تحقیق تا حدودی با نتایج مهاجری در تناقض می باشد (۲۵) اما با نتایج کارتیکا (۲۶) و رهبر (۲۷) هم خوانی دارد که این می تواند ناشی از نحوه مطالعه و زمان اجرای تحقیق باشد. همچنین بر خلاف توگنیم (۲۸) موثرترین دارو را جهت درمان عفونت های ناشی از اسیتوباکتر پلی میکسین B معرفی نمودیم.

یافته های مطالعه حاضر نشان داد که مقاومت آنتی بیوتیکی در اسیتوباکتر بومانی های مورد مطالعه بالا بوده است که با مطالعه ی جوشی که میزان اسیتوباکتر بومانی مقاوم به چند دارو را ۷۵٪ گزارش داده بود (۲۹) هم خوانی داشت، اما بر خلاف مطالعه ی حاضر، بایوگو میزان اسیتوباکتر بومانی مقاوم به چند دارو را ۴۵٪ گزارش داده است که احتمالاً دلیل آن موقعیت مختلف جغرافیایی و استفاده غیر یکسان از آنتی بیوتیک ها بوده است.

درصد فراوانی مولدین ESBL در این مطالعه با مطالعه شاهچراغی و همکارانش در تهران (۱۸،۹٪) (۱۵) و مطالعه ای که توسط سینها و همکارانش در هند انجام شد (۲۸٪) (۶) و گزارش هایی که از بلغارستان (۲۸٪) (۱۶) و قبرس (۱۶٪) (۲۲)، که بر روی مولدین ESBL انجام گرفت و همچنین با این مطالعه تا حدی هم خوانی دارد، در حالی که با مطالعه بهادر و همکارانش که در شیراز انجام دادند و میزان فراوانی ESBL را ۴۴٪ اعلام کردند، متفاوت می باشد (۳۲).

درصد فراوانی شیوع bla_{NDM} در این مطالعه ۲۰٪ گزارش شد که این گزارش بر خلاف مطالعاتی که توسط توگنیم و همکارانش در سال ۲۰۱۱ (۵۵٪) می باشد (۲۸) که نشان داده می شود با گذشت زمان درصد شیوع bla_{NDM} رو به کاهش بوده است که این

وسیع سفالوسپورین های وسیع الطیف در بخش های مختلف بیمارستان باشد به طوری که شاهد افزایش روز افزون میزان الگوی مقاومت های دارویی بویژه ESBLها در بخش های مراقبت ویژه بیمارستانی هستیم. همچنین مطالعات فراوانی ارتباط نزدیک بین استفاده قبلی و تجربی از آنتی بیوتیک های بتالاکتام با پیدایش و افزایش مکانیسم های تولید کننده این انزیم ها را نشان می دهد، این موضوع تاکید بر این نکته دارد که مصرف صحیح آنتی بیوتیک ها در بیمارستان ها و کنترل عفونت ها بخصوص در بخش های مراقبت های ویژه نقش مهمی در جلوگیری از ظهور این گونه سوش ها و عفونت های ناشی از آن ها دارد.

افزایش میزان شیوع بیمارستانی اسینتوباکتر بومانی، لزوم طراحی برنامه های حفاظتی نظیر کنترل عفونت های ایجاد شده در بخش مراقبت های ویژه را خاطر نشان می کند. همچنین با استفاده از روش های مولکولی می توان این باکتری ها را شناسایی و ویژگی مقاومت آنتی بیوتیکی آن ها را تعیین کرد و متناسب با آن آنتی بیوتیک ها را تجویز نمود.

محدود کردن استفاده از آنتی بیوتیک ها، گسترش و تغییر طرح های نظافت برای تجهیزات آلوده و دسته بندی بیمارانی که این باکتری در آن ها مستقر شده است، راهکار مفیدی برای کنترل انتشار این باکتری می باشد.

تقدیر و تشکر

از زحمات معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد و مدیریت بیمارستان آیت الله کاشانی شهرکرد که در این پروژه تحقیقاتی نهایت همکاری را داشتند، سپاسگزاریم و از تلاش بی دریغ استاد بزرگوار جناب دکتر علی هاشمی از دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی در جهت ایده پردازی و راهنمایی های بی دریغ ایشان نهایت تشکر را داریم.

References

1. Howard A, O'Donoghue M, Feeney A, Sleator RD. *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. *Virulence*. 2012 May 1;3(3):243-50.
2. Song JY, Kee SY, Hwang IS, Seo YB, Jeong HW, Kim WJ, et al. *In vitro* activities of

کاهش در فراوانی شیوع *bla_{VIM}* هم قابل شهود می باشد زیرا در سال ۲۰۰۶ طی مطالعه فیت و همکارانش درصد شیوع *bla_{VIM}* (۲۵٪) گزارش شده است (۱۰)، در حالی که در مطالعه حاضر درصد شیوع *bla_{VIM}* ۱۷ درصد گزارش شده است که این کاهش شیوع می تواند به دلیل موقعیت جغرافیایی، موقعیت مطالعه و نحوه نمونه گیری باشد.

عدم تطابق نتایج این بررسی با مطالعات ذکر شده می تواند به دلیل نوع نمونه های مورد بررسی و نوع دیسک آنتی بیوتیکی مصرفی و اجرای آنتی بیوگرام باشد. همچنین می توان گفت که این اختلاف به این دلیل می تواند باشد که مصرف بی رویه این آنتی بیوتیک باعث پیدایش سویه هایی با مقاومت بالا در این بیمارستان ها شده است، امروزه میزان گونه های جدا شده حاوی مقاومت به سفالوسپورین ها شدیداً رو به افزایش می باشد. از طرف دیگر نیز این پژوهشگران نمونه ها را از محیط اطراف بیمارستان جدا کردند و نمونه های محیطی معمولاً به آنتی بیوتیک ها مقاوم تر از نمونه های کلینیکی هستند، در صورتی که نمونه های جمع آوری شده در این بررسی از موارد کلینیکی بوده است.

اختلافات مشاهده شده در این نتایج با سایر کشورها مربوط به الگوی مصرف آنتی بیوتیک، منطقه جغرافیایی، تفاوت در الگوی مقاومت در مناطق مختلف و مصرف بی رویه آنتی بیوتیک در کشور ما و نوع باکتری مورد آزمایش می باشد. همچنین بالا بودن میزان مقاومت سویه های مقاوم به بعضی آنتی بیوتیک ها نشان دهنده مصرف بی رویه این آنتی بیوتیک در کشور است. این در حالی است که مقاومت به آنتی بیوتیک های مروپنم و ایمپ پنم بایستی کنترل شود. در هر حال مطالعات مختلف داخلی (۳۳ و ۳۴) نشان می دهد که مقاومت به کارباپنم در سراسر دنیا در حال افزایش می باشد.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد نمونه های حاوی ژن های مقاومت به پلی میکسین B و آمپی سیلین - سولباکتام حساس و مقاومت متغیری نسبت به تتراسایکلین و جنتامایسین از خود نشان دادند و به سایر آنتی بیوتیک ها مقاوم بودند. انتشار این باکتری ها به نظر می رسد ناشی از استفاده

- carbapenem/sulbactam combination, colistin, colistin/rifampicin combination and tigecycline against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother.* 2007;60(2):317-22.
3. Munoz-Price LS, Weinstein RA. *Acinetobacter* infection. *N Engl J Med.* 2008;358(12):1271-81.
4. Neonakis I K, Spandidos DA, Petinaki E. Confronting multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: a review. *Int J Antimicrob Agents.* 2011;37(2), 102-109.
5. Aksoy MD, Çavulu , Turul HM. Investigation of metallo beta lactamases and oxacilinases in carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* strains isolated from inpatients. *Balkan Med J.* 2015;32(1):79.
6. Sinha M, Srinivasa H, Macaden R. Antibiotic resistance profile & extended spectrum beta-lactamase (ESBL) production in *Acinetobacter* species. *Indian J Med Res.* 2007;126(1):63.
7. Dexter C, Murray GL, Paulsen IT, Peleg AY. Community-acquired *Acinetobacter baumannii*: clinical characteristics, epidemiology and pathogenesis. *Expert Rev Anti-Infect Ther.* 2015;13(5):567-73.
8. Bonnin R, Poirel L, Naas T, Pirs M, Seme K, Schrenzel J, et al. Dissemination of New Delhi metallo- β -lactamase-1-producing *Acinetobacter baumannii* in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(9):E362-E5.
9. Song JY, Kee SY, Hwang IS, Seo YB, Jeong HW, Kim WJ, et al. In vitro activities of carbapenem/sulbactam combination, colistin, colistin/rifampicin combination and tigecycline against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother.* 2007;60(2):317-22.
10. Fiett J, Baraniak A, Mrówka A, Fleischer M, Drulis-Kawa Z, Naumiuk Ł, et al. Molecular epidemiology of acquired-metallo- β -lactamase-producing bacteria in Poland. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(3):880-6.
11. Wayne P. Clinical and laboratory standards institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 2011.
12. Bauer A, Kirby W, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.* 1966;45(4-ts):493-6.
13. Huang ZY, Li J, Shui J, Wang HC, Hu YM, Zou MX. Co-existence of blaOXA-23 and blaVIM in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates belonging to global complex 2 in a Chinese teaching hospital. *Chinese Med J.* 2019 May 20;132(10):1166-72.
14. Aruhomukama D, Najjuka CF, Kajumbula H, Okee M, Mboowa G, Sserwadda I, et al. bla VIM-and bla OXA-mediated carbapenem resistance among *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the Mulago hospital intensive care unit in Kampala, Uganda. *BMC Infect Dis.* 2019 Dec 1;19(1):853.
15. Shahcheraghi F, Abbaslipour M, Feizabadi M, Ebrahimipour G, Akbari N. Isolation and genetic characterization of metallo- β -lactamase and carbapenamase producing strains of *Acinetobacter baumannii* from patients at Tehran hospitals. *Iran J Microbiol.* 2011;3(2):68.
16. Constantiniu S, Romaniuc A, Iancu SL. Cultural and biochemical characteristics of *Acinetobacter* spp. Strains isolated from hospital units. *J Prev Med.* 2012;(12):35-42.
17. Hujer KM, Hamza NS, Hujer AM, Perez F, Helfand MS, Bethel CR, et al. Identification of a new allelic variant of the *Acinetobacter baumannii* cephalosporinase, ADC-7 β -lactamase: defining a unique family of class C enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Jul 1;49(7):2941-8.
18. Karlowsky JA, Draghi DC, Jones ME, Thornsberry C, Friedland IR, Sahm DF. Surveillance for antimicrobial susceptibility among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* from hospitalized patients in the United States, 1998 to 2001. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003 May 1;47(5):1681-8.
19. Kilic A, Li H, Mellmann A, Basustaoglu AC, Kul M, Senses Z, et al. *Acinetobacter septicus* sp. nov. association with a nosocomial outbreak of bacteremia in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol.* 2008 Mar 1;46(3):902-8.
20. Sung JY, Kwon KC, Cho HH, Koo SH. Antimicrobial resistance determinants in imipenem-nonsusceptible *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex isolated in Daejeon, Korea. *Korean J Lab Med.* 2011;31(4):265-70.
21. Hu H, Hu Y, Pan Y, Liang H, Wang H, Wang X, et al. Novel plasmid and its variant harboring both a blaNDM-1 gene and type IV secretion system in clinical isolates of *Acinetobacter lwoffii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(4):1698-702.
22. Smolyakov R, Borer A, Riesenber 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.
23. Karah N, Sundsfjord A, Towner K, Samuelsen Ø. Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii*. *Drug Resist Updates.* 2012 Aug 1;15(4):237-47.
24. Jaggi N, Sissodia P, Sharma L. *Acinetobacter baumannii* isolates in a tertiary care hospital: Antimicrobial resistance and clinical significance. *J Microbiol Infect Dis.* 2012 Jun 1;2(02):57-63.
25. Mohajeri P, Farahani A, Feizabadi MM, Ketabi

H, Abiri R, Najafi F. Antimicrobial susceptibility profiling and genomic diversity of *Acinetobacter baumannii* isolates: A study in western Iran. *Iran J Microbiol.* 2013 Sep;5(3):195.

26. Karthika RU, Rao RS, Sahoo S, Shashikala P, Kanungo R, Jayachandran S, Prashanth K. Phenotypic and genotypic assays for detecting the prevalence of metallo- β -lactamases in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from a South Indian tertiary care hospital. *J Med Microbiol.* 2009 Apr 1;58(4):430-5.

27. Rahbar M, Mehrgan H, Aliakbari NH. Prevalence of antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* in a 1000-bed tertiary care hospital in Tehran, Iran. *Indian J Pathol Microbiol.* 2010 Apr 1;53(2):290.

28. Tognim MC, Andrade SS, Silbert S, Gales AC, Jones RN, Sader HS. Resistance trends of *Acinetobacter* spp. in Latin America and characterization of international dissemination of multi-drug resistant strains: five-year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Int J Infect Dis.* 2004 Sep 1;8(5):284-91.

29. Joshi SG, Litake GM, Niphadkar KB, Ghole VS. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from a teaching hospital. *J Infect Chemother.* 2003 Jun 1;9(2):187-90.

30. Sinha N, Agarwal J, Srivastava S, Singh M. Analysis of carbapenem-resistant *Acinetobacter* from a tertiary care setting in North India. *Indian J Med Microbiol.* 2013 Jan 1;31(1):60.

31. Amudhan MS, Sekar U, Kamalanathan A, Balaraman S. blaIMP and blaVIM mediated carbapenem resistance in *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species in India. *J Infect Develop Count.* 2012;6(11):757-62.

32. Bahador A, Taheri M, Pourakbari B, Hashemizadeh Z, Rostami H, Mansoori N, et al. Emergence of rifampicin, tigecycline, and colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* in Iran; spreading of MDR strains of novel International Clone variants. *Microb Drug Resist.* 2013;19(5):397-406.

33. Mansouri S, Neyestanaki DK, Shokoohi M, Halimi S, Beigverdi R, Rezagholezadeh F, et al. Characterization of AmpC, CTX-M and MBLs types of β -lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* producing extended spectrum β -lactamases in Kerman, Iran. *Jundishapur J Microbiol.* 2014;7(2).

34. Fallah F, Noori M, Hashemi A, Goudarzi H, Karimi A, Erfanimanesh S, et al. Prevalence of blaNDM, blaPER, blaVEB, blaIMP, and blaVIM genes among *Acinetobacter baumannii* isolated from two hospitals of Tehran, Iran. *Scientifica.* 2014;2014.