Journal of Microbial World
Volume 14, No. 4, March 2022

Original Article

Genetic diversity of colistin-resistant Acinetobacter baumannii isolates in patients of Shahid Rajaee Trauma Hospital in Shiraz

Shahriar Sepahvand[1], Mahboobeh Madani[2], Mohammad Ali Davarpanah[3], Fereshte Ghandehari[4]

[1]Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.
[2]Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.
[3] Shiraz HIV/AIDS Research Center, Institute of Health, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
[4]Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

Abstract

Background & Objectives: *Acinetobacter baumannii* is the clinically significant bacteria easily capable acquiring multi-resistance to antibiotics. This study aims to evaluate the pattern of resistance, colistin resistance gene, and the study of genetic diversity of colistin-resistant strains isolated from Shahid Rajaee Hospital in Shiraz.

Materials & Methods: This descriptive cross-sectional study was conducted on *A. baumannii* strains isolated from patients admitted to the intensive care unit ICU of Shahid Rajaei Hospital in Shiraz. *A. baumannii* strains were identified and confirmed by Microgen kit and *bla*OXA-51 gene. Antibiotic susceptibility testing was then performed by disk diffusion method according to CLSI 2020 instructions. PCR method was used to study *pmr*A and *pmr*B genes and also genetic diversity of *A. baumannii* strains was analyzed by SPSS software and NTSYS version2.10e.

Results: Fifty strains of *A. baumannii* were isolated and identified. These strains had multi-resistance and showed high resistance to most antibiotics. The lowest rate of resistance was observed to colistin and tigecycline antibiotics. In the study of colistin-resistance genes, colistin-susceptible and colistin-resistant strains of *A. baumannii* carried *pmr*A and *pmr*B genes, respectively. Colistin-resistant strains were placed next to colistin-sensitive strains in a node in the dendrogram.

Conclusion: The results of the present study revealed the frequency of multi-resistant *A. baumannii* strains in the hospital. These strains belonged to a common clone and seem to be circulating in the hospital. Infection control programs are required to be implemented in hospital wards.

Keywords: *Acinetobacter baumannii,* colistin, Genetic diversity, rep-PCR.

Received: 13 September 2021 Revised: 21 December 2021 Accepted: 4 February 2022

Correspondence to: Mahboobeh Madani
Tel: +98 3136273427
E-mail: madani.mahb@gmail.com

Journal of Microbial World 2022, 14(4): 29-40
DOI:10.30495/jmw.2021.690458

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.

مجله دنیای میکروب‌ها
سال چهاردهم شماره چهارم (پیاپی ۴۹) زمستان ۱۴۰۰
صفحات ۴۰-۲۹

Original Article

تنوع ژنتیکی سویه‌های *اسینتوباکتر بامانی* مقاوم به آنتی‌بیوتیک کولیستین جدا شده از بیمارانِ بیمارستان ترومای شهید رجایی شیراز

شهریار سپهوند[۱]، محبوبه مدنی[۲*]، محمد علی داورپناه[۳]، فرشته قندهاری[۴]

[۱]گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران. [۲]گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران. [۳]بیماری‌های عفونی و تب دار، مرکز تحقیقات اچ آی وی و ایدز شیراز، دانشکده علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران. [۴]گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: اسینتوباکتر بامانی یکی از باکتری‌های مهم بیمارستانی می‌باشد که به راحتی در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مختلف مقاومت کسب می‌کند. هدف از این پژوهش ارزیابی الگوی مقاومت، ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک کولیستین و همچنین بررسی تنوع ژنتیکی سویه‌های مقاوم به کولیستین می‌باشد.

مواد و روش‌ها: شناسایی و تایید سویه‌های اسینتوباکتر بامانی توسط کیت میکروژن و ژن blaOXA-51 صورت گرفت. حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش انتشار دیسک و MIC بر اساس دستورالعمل CLSI 2020 انجام شد. ژن‌های pmrA و pmrB با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و تنوع ژنتیکی سویه‌ها به روش rep-PCR بررسی شد. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS و NTSYS version2.10e انجام شد.

یافته‌ها: سویه‌های اسینتوباکتر بامانی داری مقاومت چندگانه بودند و در برابر بیشتر آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت بالایی نشان دادند. کمترین میزان مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های کولیستین و تیگه‌سیکلین مشاهده شد. در بررسی ژن‌های مقاومت به کولیستین، سویه‌های حساس و مقاوم اسینتوباکتر بامانی در برابر کولیستین حامل ژن‌های pmrA و pmrB بودند.سویه‌های مقاوم به کولیستین در کنار سویه‌های حساس در یک گروه در دندوگرام قرار گرفتند.

نتیجه‌گیری: نتایج تحقیق حاضر نشان دهنده فراوانی سویه‌های اسینتوباکتر بامانی مقاوم به چنددارو در بیمارستان مورد مطالعه بود که این سویه‌ها متعلق به یک کلون مشترک و در حال گردش و گسترش می‌باشند. بنابراین اجرای برنامه‌های کنترل عفونت در بخش‌های بیمارستان لازم و ضروری است.

واژگان کلیدی: اسینتوباکتر بامانی، کولیستین، تنوع ژنتیکی، rep-PCR.

دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۶/۲۲ ویرایش مقاله: ۱۴۰۰/۹/۳۰ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۱۱/۱۵

مقدمه

اسینتوباکتر بامانی یک باسیل گرم منفی غیر تخمیری و فرصت طلب می‌باشد که مسئول طیف وسیعی از عفونت‌های موضعی و سیستمیک از جمله پنومونی، سپتیسمی و عفونت‌های زخم می‌باشد. مهم‌ترین عفونتی که این باکتری ایجاد می‌کند پنومنی بیمارستانی به ویژه پنومنی وابسته به دستگاه تنفسی در بیماران بخش‌های مراقبت ویژه می‌باشد (۱). انجمن بیماری‌های عفونی امریکا این باکتری را جزء یکی از شش میکروارگانیسم

*) آدرس مکاتبه: گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.
تلفن: ۰۳۱ ۳۶۲۷۳۴۲۷ پست الکترونیک: madani.mahb@gmail.com

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

خطرناک بیمارستانی در نظر گرفته است (۲). به طور کلی پذیرفته شده که *اسینتوباکتر بامانی* از نظر پزشکی مهم‌ترین گونه‌ی اسینتوباکتر می‌باشد (۳). این باکتری به عنوان میکروارگانیسمی با بیماری‌زایی پایین در نظر گرفته می‌شود، به جز در مواردی که از بیماران دارای نقص در سیستم ایمنی و یا بیمارانی که از بیماری‌های دیگر رنج می‌برند، جداسازی شود. این باکتری یکی از مهم‌ترین بیماری‌زاهای بیمارستانی است که افراد بستری در بیمارستان نسبت به افراد خارج از محیط بیمارستان بیشتر مستعد عفونت با این باکتری می‌باشند (۳). توانایی *اسینتوباکتر بامانی* در مقاومت به انتی‌بیوتیک‌های مختلف و زنده ماندن در شرایط سخت محیطی باعث شده است که شیوع عفونت‌های *اسینتوباکتر بامانی* در افرادی که اخیرا تحت عمل جراحی قرار گرفته‌اند، افرادی که مبتلا به بیماری‌های بدخیم یا سوختگی هستند، بیماران دارای سیستم ایمنی ضعیف مانند سالمندان، نوزادان با وزن تولد پایین و بیماران مبتلا به بیماری‌های طولانی مدت بسیار بالا و خطرناک باشد (۳). سویه‌های *اسینتوباکتر بامانی* برای تبادل ژنتیکی مناسب بوده که این تبادل ژنتیکی برای دستیابی به مواد ژنتیکی خارجی، به ویژه ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها محتمل می‌باشد. بقای سویه‌های *اسینتوباکتر بامانی* به مدت طولانی در بخش‌های مختلف بیمارستان‌ها باعث شده است که این میکروارگانیسم به راحتی در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مختلف مقاوم شود. در ۳۰ سال گذشته سویه‌های *اسینتوباکتر بامانی*، مقاومت به داروهای ضد میکروبی تازه توسعه یافته را کسب کرده، که به عنوان Multidrug-resistant Acinetobacter baumannii شناخته می‌شوند. شیوع این سویه در بسیاری از بیمارستان‌های سراسر جهان گزارش شده است (۵). *اسینتوباکتر بامانی* مقاوم در برابر چنددارو حداقل به سه گروه از داروهای ضدمیکروبی، یعنی به همه‌ی پنی‌سیلین‌ها، فلوروکینولون‌ها، سفالوسپورین‌ها و به آمینوگلیکوزیدها مقاومت نشان می‌دهد (٦).

امروزه *اسینتوباکتر بامانی* در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مختلف مقاومت نشان داده به طوری‌که گزینه‌های درمانی برای این باکتری بسیار کم شده است .کولیستین و تیگه‌سیکلین آخرین گزینه‌های درمان در برابر باکتری‌های مقاوم به چنددارو می‌باشند (۷). متاسفانه امروزه مقاومت *اسینتوباکتر بامانی* در برابر این آنتی‌بیوتیک در سر تا سر دنیا از جمله در ایران در حال افزایش است (۸). در حال حاضر دو فرضیه اصلی در مورد مکانیسم مقاومت *اسینتوباکتر بامانی* به کولیستین وجود دارد. اولین فرضیه از دست دادن لیپوپلی ساکارید است که توسط موفات و همکاران در سال ۲۰۱۰ پیشنهاد شد (۹). آن‌ها ابتدا متوجه غیر فعال شدن ژن‌های مسئول بیوسنتز لیپید A یعنی *lpx*A، *lpx*C یا *lpx*D شدند که نتیجه آن تولید نشدن لیپوپلی ساکارید به طور کامل در *اسینتوباکتر بامانی* می‌باشد. به دنبال از دست دادن کامل لیپوپلی ساکارید، بیان سیستم‌های بیوسنتز و حمل و نقل‌های حیاتی که با تنظیم ترکیب و ساختار سطحی باکتری همراه می‌باشد در *اسینتوباکتر بامانی* تغییر می‌کند (۱۰). در سویه‌های مقاوم به کولیستین کاهش بار منفی لیپوپلی ساکارید دلیلی برای تمایل کمتر به آنتی‌بیوتیک کولیستین می‌باشد (۱۱). فرضیه دوم مقاومت از طریق سیستم *Pmr*AB می‌باشد که در سال ۲۰۰۹ برای اولین بار توسط آدامز و همکاران پیشنهاد شد (۱۲). آن‌ها با مقایسه توالی DNA ژن‌های کدکننده *Pmr*A و *Pmr*B بین سویه‌های حساس و مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک کولیستین پی بردن مقاومت *اسینتوباکتر بامانی* به کولیستین با جهش در ژن *pmr*A و *pmr*B در ارتباط می‌باشد (۱۳).

در گذشته از ویژگی‌های فنوتیپی برای دسته بندی عوامل عفونی استفاده می‌شد ولی امروزه از روش‌های مولکولی به دلیل تکرار پذیری، سرعت بالا و اختصاصیت بیشتر استفاده می‌کنند. از روش‌های مولکولی مانند RAPD-PCR، ERIC-PCR، BOX-PCR، REP-PCR و MLST در تایپینگ مقاومت دارویی عوامل عفونی از جمله *اسینتوباکتر بامانی* استفاده می‌شود (١٤).

در این مطالعه ما الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، ژن‌های مقاومت و تنوع ژنتیکی سویه‌های *اسینتوباکتر بامانی* مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک کولیستین را مورد مطالعه قرار دادیم.

مواد و روش‌ها

الف) جمع‌آوری نمونه و شناسایی اولیه: این مطالعه بر اساس تاییدیه اخلاق (IR.IAU.FALA.REC.1399.027) توسط کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان انجام شد. نمونه‌گیری از نمونه‌های خون، زخم،تنفسی و ادرار بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان‌های ترومای شهید رجایی شیراز انجام شد. کشت اولیه بر روی محیط کشت‌های بلاد آگار و مک کانکی آگار انجام شد. پس از رشد باکتری بر روی محیط کشت‌های استفاده شده، رنگ‌آمیزی گرم و تست اکسیداز انجام شد. در مرحله بعد نمونه‌های اکسیداز منفی با استفاده از رشد در دمای ۴۲ درجه سلسیوس و تست سیترات بررسی شد سپس تعیین هویت با استفاده از کیت میکروژن و بررسی ژن blaOXA-51 انجام شد (۱۵).

ب) شناسایی جدایه‌ها به وسیله کیت میکروژن: GN-A نوار کیت میکروژن GN-A 12 چاهک دارد که عبارتند از: چاهک ۱: لایزین، چاهک ۲: اورنیتین، چاهک ۳: H2S، چاهک ٤: گلوکز، چاهک ٥: مانیتول، چاهک ٦: گزیلوز، چاهک ۷: ONPG، چاهک ۸: ایندول، چاهک ۹: اوره‌آز، چاهک ۱۰: VP، چاهک ۱۱: سیترات و چاهک ۱۲: TDA این چاهک‌ها برای شناسایی اسینتوباکتر طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت مورد استفاده قرار گرفتند. (www.microgenbioproducts.com) بدین صورت که ابتدا یک کلنی از جدایه‌ها انتخاب و سپس کلنی در ۳ میلی‌لیتر محلول نمکی امولسیون شد، ۳ تا ٤ قطره از سوسپانسیون به چاهک‌ها اضافه شد در ادامه با استفاده از روغن معدنی چاهک‌ها پر و به مدت ۱۸ تا ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری انجام شد. بعد از گرماگذاری معرف به چاهک‌ها افزوده و سپس با استفاده از راهنمای رنگی و نرم افزار شناسایی خوانش و ثبت نتایج انجام شد.

ج) واکنش زنجیره‌ای پلیمراز: پس از کشت دوباره جدایه‌های تعیین هویت شده *اسینتوباکتر بامانی* بر روی محیط کشت مک کانکی آگار، DNA تمام جدایه‌ها با استفاده از کیت استخراج DNA (Bioneer, Korea) استخراج شدند. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. این واکنش شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مستر میکس (Amplicon, Denmark) ۱/۵ میکرولیتر از آغازگر رفت و ۱/۵ میکرولیتر از آغازگر برگشت (به سفارش شرکت بسپار یاخته نو ترکیب و ساخت توسط شرکت Bioneer, Korea) ۲/۵ میکرولیتر DNA الگو و ۷ میکرولیتر آب مقطر می‌باشد. توالی آغازگرها و شرایط مورد استفاده جهت تکثیر ژن‌های *bla*OXA-51، REP، *pmr*A و *pmr*B برای هر جدایه در جدول شماره ۳ نشان داده شده است. الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز توسط ژل آگارز ۱٪ انجام شد سپس باندها به وسیله دستگاه ژل‌داک عکس برداری شدند. از نشانگر ۱kb، ۱۰۰ جفت بازی و ۵۰ جفت بازی محصول کمپانی (GenedireX) تولید مشترک تایوان و امریکا برای شناسایی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده شد (۱۷و۱٦و۱۸).

جدول۱: توالی آغازگرها و شرایط مورد استفاده در تکثیر.

پرایمر	توالی پرایمر	شرایط PCR	اندازه باند (bp)	منبع
PmrA-F *Pmr*A-R *Pmr*B-F *Pmr*B-R	ATGACAAAAATCTTGATGATTGAAG AT CCATCATAGGCAATCCTAAATCCA GAACAGCTGAGCACCCTTTAA ACAGGTGGAACCAGCAAATG	° 94C 5min 30Cycle °94C 25 sec ° 57C 40 sec °72C 50 sec °72C 6min	175	(16)
REP1 REP2	IIIGCGCCGICATCAGGC ACGTCTTATCAGGCCTAC	° 95C 3 min 30Cycle 90°C 30 sec 45°C 1 min 68°C 8 min 65°C 16min	145	(17)
*bla*OXA-51 -F *bla*OXA-51 -R	TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG	° 94C 10min 30Cycle °94C 50 sec ° 60C 20 sec °72C 50 sec °72C 10min	353	(18)

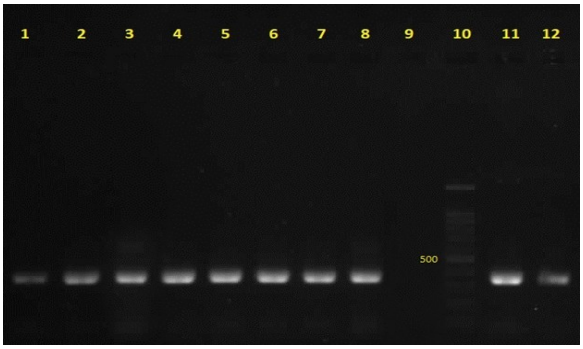
د) سنجش حساسیت آنتی بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن و MIC: برای انجام آنتی‌بیوگرام ابتدا تمام سوسپانسیون‌ها و پلیت‌ها شماره‌گذاری و سپس تست آنتی‌بیوگرام برای ۵۰ نمونه خالص شده به صورت زیر انجام شد. سوسپانسیون *اسینتوباکتر بامانی* (معادل با ۰/۵ مک فارلند) را به آرامی در چند جهت

مختلف روی محیط کشت مولرهینتون (Merck, Germany)، کشت داده به گونه‌ای که به صورت یکنواخت روی محیط کشت پخش شود. پس از خشک شدن سطح محیط که نباید بیش از یک ربع ساعت طول بکشد، دیسک‌های آنتی‌بیوتیک سفکسیم (۵ میکروگرم)، تیکارسیلین (۱۰ میکروگرم)، سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، آزترئونام (۳۰ میکروگرم)، کوآموکسی کلاو (۳۰ میکرگرم)، آمپی‌سیلین (۲۵ میکروگرم)، تیگه‌سیکلین (۱۰ میکروگرم)، ایمی‌پنم (۱۰ میکروگرم)، آمیکاسین (۳۰ میکروگرم)، کولیستین (۱۰ میکروگرم)، مروپنم (۱۰ میکروگرم)، ریفامپین (۳۰ میکروگرم) و تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم) شرکت (MAST) انگلستان توسط پنس استریل با فاصله بر روی محیط کشت‌های مولرهینتون قرار داده شدند. پلیت‌ها به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند. سپس توسط خط‌کش هاله‌های عدم رشد اندازه‌گیری و با جداول موجود برای آنتی‌بیوتیک‌های مختلف مطابقت داده شد (۱۹). MIC به وسیله نوارهای E-test مربوط به کولیستین انجام شد. فرایند مشابهی مانند انتشار دیسک انجام و نوارهای E-test (Liofilchem, Italy) کولیستین بر روی محیط کشت مولرهینتون قرار داده شد (۲۰).

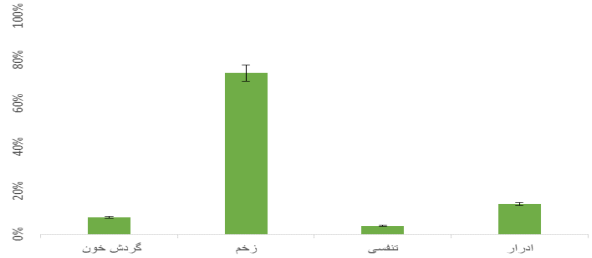
ه) تجزیه و تحلیل داده‌ها: آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۶ و همچنین برای ترسیم درخت فیلوژنتیکی و آنالیز تصاویر حاصل از الکتروفورز نمونه‌های مورد مطالعه با استفاده از نرم افزار (NTSYS version2.10e) انجام شد (۲۱).

یافته‌ها

الف) باکتری های مورد مطالعه : ۵۰ سویه *اسینتوباکتر بامانی* پس از حذف جدایه‌های تکراری و غیر مرتبط از لحاظ بالینی شناسایی و تعیین هویت شدند. نمونه‌های مورد مطالعه دارای ژن *bla*OXA-51 بودند، این ژن مختص این گونه می‌باشد (شکل ۱). در این مطالعه سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی از نمونه‌های مختلف شامل* :۴۰ نمونه گردش خون،۳۷ نمونه زخم،۲ نمونه تنفسی و ۷ نمونه ادرار از بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان ترومای شهید رجایی جدا شدند که بیشترین تعداد سویه‌های *اسینتوباکتر بامانی* از نمونه زخم جداسازی و کمترین سویه‌ها از نمونه‌های تنفسی جدا شدند (نمودار ۱).



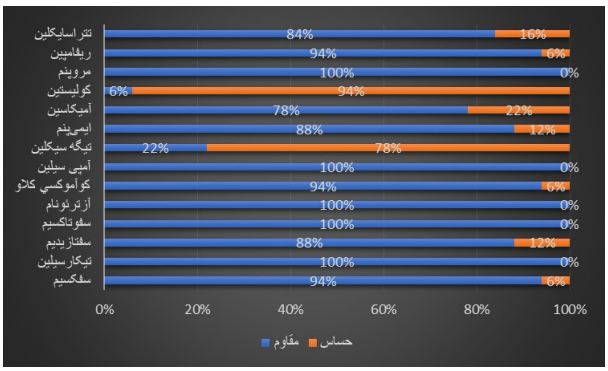
شکل ۱: نتایج الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای ژن *bla*OXA-51 با اندازه ۳۵۳ جفت بازستون‌های شماره ۱ تا ۸، ۱۱ و ۱۲ : *bla*OXA-51، ستون شماره ۹ : کنترل منفی و ستون شماره ۱۰ نشانگر ۱۰۰ جفت بازی.



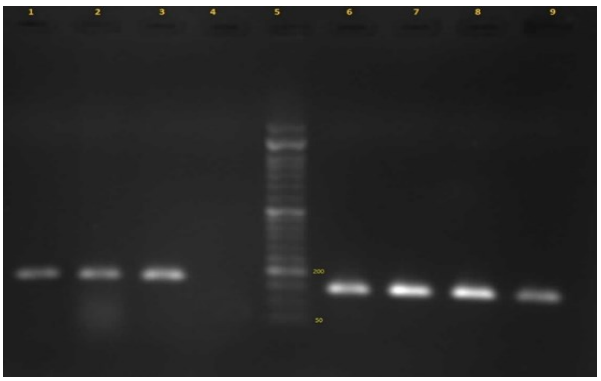
نمودار۱: فراوانی نمونه‌های بالینی.

ب) مقاومت آنتی‌بیوتیک: در روش انتشار دیسک سویه‌های *اسینتوباکتر بامانی* جدا شده نسبت به بیشتر آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه در این تحقیق مقاومت نشان دادند، کمترین میزان مقاومت در برابر کولیستین و تیگه‌سیکلین مشاهده شد، به طوری‌که مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک کولیستین ۶٪ و تیگه‌سیکلین ۲۲٪ بود (نمودار ۲). در بررسی مقاومت جدایه‌ها به کولیستین بر اساس E-test ۳ جدایه مقاوم به کولیستین و ۴۷ جدایه در برابر این آنتی‌بیوتیک حساس بودند.

ج)نتایج حاصل از زنجیره پلی مراز ژن‌های *pmr*A و *pmr*B : در این مطالعه ۵۰ جدایه *اسینتوباکتر بامانی* حامل ژن *pmr*A و ۴۶ جدایه حامل ژن *pmr*B بودند. این ژن‌ها در مقاومت این باکتری در برابر کولیستین نقش دارند (۲۲)(شکل ۲).

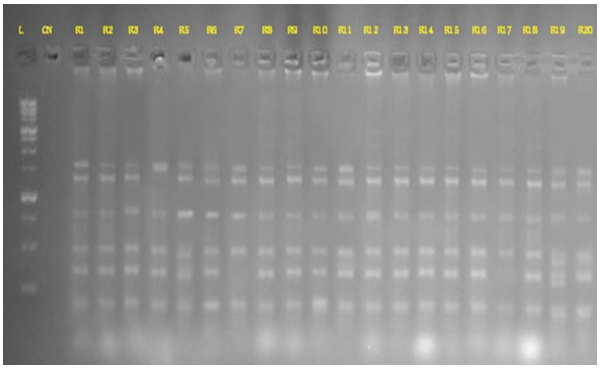


نمودار ۲: الگوی مقاومت سویه‌های *اسینتوباکتر بامانی* بیمارستان شهید رجایی شیراز.

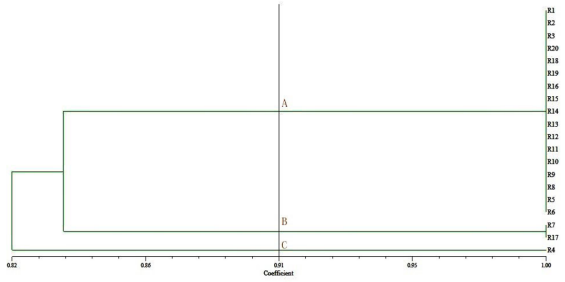


شکل ۲: الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای ژن‌های *pmr*A و *pmr*B . ستون‌های شماره ۱ تا ۳: *pmr*A با اندازه ۱۷۵ جفت باز و ستون شماره ٤: کنترل منفی، ستون شماره ٥: نشانگر ۵۰ جفت بازی و ستون شماره ٦ تا ۹: *pmr*B با اندازه ۱٤٥ جفت باز.

د) نتایج حاصل از تنوع ژنتیکی سویه‌های اسینتوباکتر بامانی: در این روش دسته‌بندی ژنتیکی ۲۰ جدایه *اسینتوباکتر بامانی* از بیماران بیمارستان شهید رجایی پس از اطمینان از حضور قطعات تکثیر یافته در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (شکل ۳)، با روش rep-PCR آنالیز شدند. پس از آنالیز ژل الکتروفورز بر اساس صفر (عدم وجود باند) و یک (وجود باند) شباهت ژنتیکی بر اساس داده‌های ۰ و ۱ با استفاده از ضرایب جاکارد، دایس و تطابق ساده محاسبه شد. ضریب کوفنتیک جاکارد (۹۷۹۹۱) بیشتر از ضرایب کوفنتیک تشابه دایس و تطابق ساده بود به همین دلیل برای ترسیم درخت فیلوژنی از این ضریب استفاده شد. دندروگرام حاصل از نشانگر rep-PCR ۲۰ جدایه *اسینتوباکتر بومانی* در سطح تشابه ۹۱ درصد در دسته (A،B و C) قرار گرفتند (شکل ٤).



شکل ۳ : ژل حاصل از الکتروفورز محصول نشانگر rep-PCR روی جدایه *اسینتوباکتر بامانی* (جدایه‌های ۱ تا ۲۰) (ستون L نشانگر 1kb و CN کنترل منفی).



شکل ٤: دندوگرام حاصل از آزمایش rep-PCR با ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA و Cut off 91 درصد.

بحث

امروزه عفونت‌های بیمارستانی ناشی از *اسینتوباکتر بامانی* مقاوم به چند دارو به یک مشکل جدی در مراقبت‌های بهداشتی در دنیا تبدیل شده است. درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری در کشورهای آسیایی مانند ترکیه، ایران، هند نیز مشکل می‌باشد. بیماران در بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان‌ها از آنجایی که به لحاظ سلامتی شرایط مطلوبی ندارند بیشتر در معرض عفونت‌های این بیماری‌زا قرار دارند. در مطالعه حاضر سویه‌های *اسینتو باکتر بامانی* از بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان شهید رجایی شهر شیراز جدا سازی شدند. در مطالعه شیخ بایگلو و همکارانش میزان شیوع *اسینتو باکتر بامانی* را در بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان سوختگی اصفهان پس از حذف نمونه‌های نامربوط ۸۰ درصد گزارش کردند (۲۳). در مطالعه دیگری که توسط ضیغمی و همکارانش انجام شد ۱۰۰ سویه *اسینتوباکتر بامانی* را از بیماران دارای

نقص در سیستم ایمنی بستری در بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان زنجان جداسازی کردند (۲۴). هریس و همکارانش در مطالعه بر روی بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه مرکز پزشکی دانشگاه مریلند از سال ۲۰۱۱ تا ۲۰۱۳ گزارش کردند که ۶۹ بیمار به دنبال ماندن در بخش مراقبت‌های ویژه آلوده به عفونت *اسینتوباکتر بامانی* شده بودند (۲۵). به نظر می‌رسد مطالعات انجام شده با مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد و نشان دهنده این مهم می‌باشند که *اسینتوباکتر بامانی* یکی از میکروارگانیسم‌های شایع در بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان‌ها است.

اسینتوباکتر بامانی باعث عفونت‌هایی از قبیل آندوکاردیت، عفونت پوست و بافت نرم، مننژیت، عفونت ادراری و ذات‌الریه می‌شود و به همین دلیل این باکتری را می‌توان از نمونه‌های مختلف جداسازی کرد. در مطالعه حاضر بیشترین جدایه‌ها از زخم و کمترین جدایه‌ها از نمونه تنفسی به دست آمدند. در مطالعه نامیگاندا و همکارانش در سال ۲۰۱۹ *اسینتوباکتر بامانی* را از ۳۱/۵۸ درصد از نمونه‌های زخم بیماران بستری در بیمارستان که تحت عمل جراحی قرار گرفته بودند جدا کردند، همچنین سویه‌های *اسینتوباکتر بامانی* را از نمونه‌های خون و کاتتر با مقدار ۱۵/۷۹ درصد جدا کردند. میزان مشابهی (۳۲/۵٪) از نمونه‌های زخم توسط نامیگاندا و همکاران به دست آمد (۲۶). نتایج مطالعه ما با مطالعات انجام شده هم‌خوانی دارد که نشان می‌دهند *اسینتوباکتر بامانی* از نمونه‌های زخم در کنار سایر میکروارگانیسم‌ها به وفور جداسازی می‌شود. با توجه به اینکه *اسینتوباکتر بامانی* یک باکتری فرصت‌طلب است در بافت‌های آسیب دیده به راحتی موجب عفونت می‌شود. از آنجایی که عده‌ای از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان شهید رجایی به دلیل صدمات ناشی از تصادفات تحت عمل جراحی قرار می‌گیرند لذا بیشتر مستعد عفونت با *اسینتوباکتر بامانی* می‌باشند. مقاومت آنتی‌بیوتیکی یکی از بزرگ‌ترین تهدیدهای سلامت جهانی می‌باشد که نه تنها دستاوردهای دستیابی به اهداف توسعه هزاره بلکه اهداف توسعه پایدار را نیز به خطر می‌اندازد (۲۷). مقاومت آنتی‌بیوتیکی معمولاً با عوارض قابل توجه از جمله مرگ و میر، طولانی شدن بیماری و کاهش کارایی پرسنل درمان همراه است (۲۸و۳۱). امروزه درمان عفونت‌های بیمارستانی ناشی از میکروارگانیسم‌ها، به دلیل مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها، مشکلات بزرگی را برای بیماران و بخش درمان به وجود آورده است. در برخی از کشورها این شرایط به دلیل عدم کنترل عفونت، استفاده بیش از حد از آنتی‌بیوتیک‌ها و فقدان نظارت بحرانی می‌باشد (۳۲). *اسینتوباکتر بامانی* یکی از بیماری‌زاهای مهم بیمارستانی می‌باشد که کنترل عفونت‌های آن به دلیل مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف مشکل است و به همین دلیل درمان دارویی بیمارانی که وضعیت بحرانی دارند و به ویژه بیمارانی که در بخش مراقبت‌های ویژه هستند را با دشواری روبه رو می‌کند. امروزه *اسینتوباکتر بامانی* در برابر بیشتر آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم شده است و گزینه‌های درمانی اندکی برای آن باقی مانده است. یکی از این گزینه‌ها آنتی‌بیوتیک کولیستین می‌باشد که آخرین خط درمان برای این باکتری است و ما در مطالعه حاضر آن را بررسی کردیم. در مطالعه حاضر *اسینتوباکتر بامانی* در برابر بیشتر آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم بود به طوری که در برابر سفکسیم ۹۴٪، تیکارسیلین ۱۰۰درصد، سفتازیدیم ۸۸ درصد، سفوتاکسیم ۱۰۰ درصد، آزترئونام ۱۰۰ درصد، آموکسی سیلین/ کلاوولانیک ۹۴ درصد، آمپی سیلین ۱۰۰ درصد، مروپنم ۱۰۰ درصد، ریفامپین ۹۴ درصد، ایمی پنم ۸۸ درصد، تتراسایکلین۸۴ درصد، آمیکاسین ۷۸ درصد، تیگه‌سیکلین ۲۲ درصد و کولیستین ۶ درصد مقاومت نشان داد. میرزایی در مطالعه خود مقاومت *اسینتوباکتر بامانی را به* توبرامایسین و ایمی پنم هر دو ۹۷ درصد، سفتازیدیم ۹۶/۶ درصد و سیپروفلوکساسین ۹۷/۴ درصد گزارش کردند (۳۳). طبق یافته‌های حاتمی ۷۰ درصد از سویه‌های *اسینتوباکتر بامانی* به توبرامایسین و سفتازیدیم مقاوم بودند، همچنین ۵۰ درصد و ۸۰ درصد از سویه‌ها به ترتیب در برابر آمیکاسین و ایمی‌پنم مقاوم بودند (۳۴). نتایج سایر مطالعات انجام شده همراه با مطالعه حاضر نشان دهنده افزایش مقاومت *اسینتوباکتر بامانی* در برابر آنتی‌بیوتیک‌های سفتازیدیم، ایمی پنم، آمیکاسین می‌باشد.

مطالعات اندکی بر روی مکانیسم‌های مقاومت *اسینتوباکتر بامانی* در برابر آنتی‌بیوتیک کولیستین وجود دارد. در حال حاضر در این رابطه دو فرضیه برای مکانیسم مقاومت این پاتوژن در برابر آنتی‌بیوتیک کولیستین وجود دارد. اولین فرضیه جهش در ژن‌هایی می‌باشد که در ساخت لیپید A باکتری دخالت دارند این ژن‌ها شامل *lpx*A، *lpx*C یا *lpx*D می‌باشند. جهش در این ژن‌ها باعث می‌شود LPS در باکتری ساخته نشود. سویه‌های فاقد LPS در برابر کولیستین مقاوم هستند. دومین فرضیه مقاومت از طریق سیستم دو جزیی *pmr*AB است. مقاومت سویه‌های *اسینتوباکتر بامانی* نیاز به دو رویداد ژنتیکی مجزا دارد الف) حداقل تغییر یک اسید آمینه در *Pmr*B ب) بیان بالای *pmr*A و *pmr*B (۳۵). در مطالعه ما بعد از مشخص شدن الگوی مقاومت در سویه‌های *اسینتوباکتر بامانی*، وجود ژن‌های *pmr*A و*pmr*B به‌وسیله روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مورد ارزیابی قرار گرفت که مشاهده کردیم ۵۰ (۱۰۰٪) جدایه حامل ژن *pmr*A و ٤٦ (۹۲ ٪) جدایه حامل ژن *pmr*B بودند.

برای کنترل و نظارت موثر بر عفونت *اسینتوباکتر بامانی* داشتن اطلاعات دقیق در مورد تنوع ژنتیکی و تایپینگ این باکتری امری ضروری می‌باشد. روش‌های تیپ بندی به طور عمده به دو گروه فنوتیپی و و ژنوتیپی تقسیم می‌شوند. تیپ‌بندی فنوتیپی محصول بیان یک ژن یا ژن‌های خاصی را در راستای اهداف اپیدمیولوژیک مورد بررسی قرار می‌دهند که تغییر پذیری بالایی دارند. تیپ بندی ژنوتیپی بر اساس ساختار ژنتیکی میکروارگانیسم‌ها می‌باشد و کمتر تحت تاثیر عوامل محیطی قرار می‌گیرد. تعداد زیادی از روش‌ها شامل PFGE، AFLP، پلاسمید پروفایلینگ، مولتی لوکوس آنزیم الکتروفورز، rep، ریبوتایپینگ و سایر روش‌ها برای بررسی تنوع ژنتیکی در بیماری‌زاها استفاده می‌شود.در بین این روش‌ها REP-PCR سریع‌تر، ارزانتر و دقیق‌تر است و در آزمایشگاه‌های مخصوص این کار به راحتی قابل انجام می‌باشد (۳٦ و۳۷). در مطالعه حاضر ما تنوع ژنتیکی سویه‌های *اسینتوباکتر بامانی* مقاوم و حساس در برابر آنتی‌بیوتیک کولیستین را بررسی و برای ضریب تشابه (درصد شباهت) آن‌ها سه ضریب تشابه دایس، جاکارد و تطابق ساده را با هم مقایسه کردیم. با توجه به اینکه ضریب کوفنتیک جاکارد بزرگتر از ضرایب دیگر بود ما از آن استفاده کردیم زیرا هر چه ضریب کوفنتیک عدد بزرگتری باشد مقایسه سویه‌ها در سطح بالاتری انجام می‌شود (۳۷). در دندوگرام حاصل در سطح تشابه ۹۱٪ سویه‌ها به سه گروه تقسیم شدند (A,B و C) . گروه A و B شامل ۱۹ جدایه از ۲۰ جدایه مورد بررسی بودند که نشان می‌دهد متعلق به یک کلون مشترک می‌باشند و گروه C شامل یک جدایه بود که دورتر از گروه A و B قرار گرفت که خود به کلنی جدا از کلون گروه A و B تعلق دارد. در ارتباط با تنوع ژنتیکی سویه‌های مقاوم به کولیستین تا به حال تحقیقی انجام نشده است فقط تحقیقات کمی روی بررسی تنوع ژنتیکی سویه‌های مقاوم به کاربابنم انجام شده است (۳۸). در تحقیقی در ماداگاسکار که بر روی جدایه‌های *اسینتوباکتر بامانی* مقاوم به چند دارو جدا شده از دو بیمارستان انجام شد، جدایه‌های مقاوم به کاربابنم در پنج ژنوتایپ مختلف گروه‌بندی شدند که ژنوتایپ A با بیشترین فراوانی بین دو بیمارستان شناسایی شد ولی ژنوتایپ B فقط در یک بیمارستان وجود داشت .آن‌ها به این نتیجه رسیدند که سویه‌های *اسینتوباکتر بامانی* در گروه A بین این دو بیمارستان انتشار یافته اند (۳۹). در تحقیق ما ۳ سویه *اسینتو باکتر بامانی* مقاوم به کولیستین از بیمارستان شهید رجایی جداسازی شد. شامل سویه‌های شماره ۱۰ ، ۱۱ و ۱۲ که در درخت فیلوژنی در گروه A در کنار سایر سویه‌ها حساس به کولیستین قرار گرفت، در گروه‌های B و C سویه‌های حساس به کولیستین قرار گرفتند. وجود سویه‌های مقاوم به کولیستین در کنار سایر سویه‌ها نشان دهنده این موضوع است که این سویه‌ها متعلق به یک کلون مشترک می‌باشند که در بیمارستان شهید رجایی شیراز در حال گردش و گسترش هستند.

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد *اسینتو باکتر بامانی* یکی از میکروارگانیسم‌های شایع در بخش مراقبت‌های ویژه‌ی بیمارستان مورد مطالعه می‌باشد که ممکن است از طریق دست کارکنان این بخش یا انتقال بیمار از بیمارستان‌های دیگر باعث

گسترش این باکتری بین بیمارها شود .غربالگری در این بخش‌ها به دلیل اینکه بیماران این بخش‌ها به لحاظ سلامت در شرایط مناسبی نمی‌باشند ضروری است. نتایج این مطالعه نشان دهنده حضور سویه‌های *اسینتوباکتر بامانی* مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک در بیمارستان ترومای شهید رجایی شهر شیراز می‌باشد که می‌تواند موجب مشکلات جدی برای درمان سویه‌های *اسینتوباکتر بامانی* مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک در سیستم درمان شود. نتایج ما بیانگر این مسئله است که آنتی‌بیوتیک‌های کولیستین و تیگه‌سیکلین برای درمان عفونت‌های *اسینتوباکتر بومانی* گزینه‌های مناسبی می‌باشند ولی متاسفانه مقاومت در برابر این آنتی‌بیوتیک‌ها نیز در حال افزایش است. مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک کولیستین در مطالعه ما کم بود ولی از آنجایی که کولیستین آخرین گزینه برای درمان *اسینتوباکتر بامانی* می‌باشد کمترین مقاومت در برابر آن به عنوان شکست در درمان در نظر گرفته می‌شود که باید در این باره تدابیر درمانی مناسب به عمل آید. با توجه به اینکه جدایه‌های *اسینتوباکتر بامانی* مورد مطالعه در گروه‌های مختلف به وسیله rep-PCR در کنار هم قرار گرفتند نشان دهنده این مهم می‌باشد که rep-PCR ابزاری قدرتمند برای دسته بندی سویه‌های *اسینتوباکتر بامانی* مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک است.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از پرسنل بیمارستان ترومای شهید رجایی شیراز کمال تشکر و قدردانی را دارند.

تعارض در منافع

وجود ندارد.

References

1. Shaheli M, BaseriSalehi M, Bahador N. Antibiotic resistance dependent on efflux pump in the isolates of clinical and environmental Acinetobacter baumannii. J Microb World 2019, 12(1): 15-26.
2. Kyriakidis I, Vasileiou E, Pana ZD, Tragiannidis A. Acinetobacter baumannii Antibiotic Resistance Mechanisms. Pathogens. 2021;10(3):373.
3. Doughari H J, Ndakidemi P A, Human I S, Benade S. The ecology, biology and pathogenesis of Acineobacter spp: An overview. Microbes Environ.2011; 26: 101-112.
4. Alsulaiman A, Al-Hamed N, Alziadi A, Almalaihi A, Alessa M, Khalil R, Joseph R, Dhfer Alshayban D. Evaluation of Acinetobacter baumannii pneumonia among critically ill patients in a tertiary care hospital in Saudi Arabia. Heliyon. 2020; 6(5): e03976.
5. Saelim W, Changpradub D, Thunyaharn S, Juntanawiwat P, Nulsopapon P, Santimaleeworagun W. Colistin plus Sulbactam or Fosfomycin against Carbapenem-Resistant Acinetobacter baumannii: Improved Efficacy or Decreased Risk of Nephrotoxicity? Infect Chemother. 2021;53(1):128-140.

6. Yang H, Hu L, Liu Y, Ye Y, Li J. Detection of the plasmid-mediated quinolone resistance determinants in clinical isolates of Acinetobacter baumannii in China. J Chemother.2014; 1973947815Y0000000017.
7. Sato Y, Ubagai T, Tansho-Nagakawa S, Yoshino Y, Ono Y. Effects of colistin and tigecycline on multidrug-resistant Acinetobacter baumannii biofilms: advantages and disadvantages of their combination. Sci Rep. 2021;11(1):11700.
8. Cai Y, Chai D, Wang R, Liang B, Bai N. Colistin resistance of Acinetobacter baumannii: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. J Antimicrob Chemother. 2012; 67: 1607–1615.
9. Moffatt JH, Harper M, Harrison P. Colistin resistance in Acinetobacter baumannii is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54:4971–7.
10. Henry R, Vithanage N, Harrison P. Colistin-resistant, lipopolysaccharide-deficient Acinetobacter baumannii responds to lipopolysaccharide loss through increased expression of genes involved in the synthesis and transport of lipoproteins, phospholipids, and poly-b-1,6-N-acetylglucosamine. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56: 59–69.
11. Soon RL, Nation RL, Cockram S. Different surface charge of colistin-susceptible and -resistant Acinetobacter baumannii cells measured with zeta potential as a function of growth phase and colistin treatment. J Antimicrob Chemother. 2011;66: 126–33.
12. Adams MD, Nickel GC, Bajaksouzian S, Lavender H, Murthy AR, Jacobs MR, Bonomo RA. Resistance to colistin in Acinetobacter baumannii associated with mutations in the PmrAB two-component system. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53(9):3628-34.
13. Park YK, Choi JY, Shin D, Ko KS. Correlation between overexpression and amino acid substitution of the PmrAB locus and colistin resistance in Acinetobacter baumannii. Int J Antimicrob Agents. 2011;37(6):525-30.
14. Mohammadi Z, Momtaz H. Molecular typing of the Acinetobacter baumannii strains isolated from blood infections using Multi Locus Sequence Typing (MLST). J Microb World. 2017; 10 2 10 -113.
15. Castilho SRA, Godoy CSM, Guilarde AO, Cardoso JL, André MCP, Junqueira-Kipnis AP, Kipnis A. Acinetobacter baumannii strains isolated from patients in intensive care units in Goiânia, Brazil: Molecular and drug susceptibility profiles. PLoS One. 2017;12(5): e0176790.
16. Beceiro A, Llobet E, Aranda J , Bengoechea J A, Doumith M, Hornsey M, Dhanji H, Chart H, Bou G, Livermore D M, Woodford N. Phosphoethanolamine modification of lipid A in colistin-resistant variants of Acinetobacter baumannii mediated by the pmrAB two-component regulatory system. Antimicrob Agents Chemother. 2011; 55: 3370–9.
17. Carvalho KR, Carvalho-Assef APDA, Peirano G, dos Santos LCG, Pereira MJF, Asensi MD. Dissemination of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii genotypes carrying blaOXA-23 collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. Int j antimicrob agents. 2009;34(1):25-8.

18. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, Amyes SG, Livermore DM. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in Acinetobacter spp. -Int J Antimicrob Agents. 2006; 27(4):351-3.

19. Girija S, Priyadharsini JV. CLSI based antibiogram profile and the detection of MDR and XDR strains of Acinetobacter baumannii isolated from urine samples. Med J Islam Repub Iran. 2019; 33:3.

20. Arroyo LA, García-Curiel A, Pachón-Ibañez ME, et al. Reliability of the E-test method for detection of colistin resistance in clinical isolates of Acinetobacter baumannii. J Clin Microbiol. 2005;43(2):903-905.

21. Amirsardari V, Sepahvand S, Madani M. Identification of deep bark canker agent of walnut and study of its phenotypic, pathogenic, holotypic and genetic diversity in Iran. J Plant Interact. 2017; 12:340 - 347.

22. Park YK, Choi JY, Shin D, Ko KS. Correlation between overexpression and amino acid substitution of the PmrAB locus and colistin resistance in Acinetobacter baumannii. Int J Antimicrob Agents. 2011;37(6):525-30.

23. Shaykh Baygloo N, Bouzari M, Rahimi F, Abedini F, Yadegari S, Soroushnia M, Beigi F. Identification of Genomic Species of Acinetobacter Isolated from Burns of ICU Patients. Arch Iran Med.2015; 18(10): 638 – 642.

24. Zeighami H, Valadkhani F, Shapouri R, Samadi E, Haghi F. Virulence characteristics of multidrug resistant biofilm forming Acinetobacter baumannii isolated from intensive care unit patients. BMC Infectious Diseases. 2019; 19:629.

25. Harris AD, Johnson JK, Pineles L,O'Hara L M, Bonomo RA, Thom K A.Patient-to-patient transmission of Acinetobacter baumannii gastrointestinal colonization in the intensive care unit. Antimicrob Agents Chemother.2019; 63: e00392-19.

26. Namiganda V, Mina Y, Meklat A, Touati D, Bouras N, Barakate M, Sabaou N. Antibiotic Resistance Pattern of Acinetobacter baumannii Strains Isolated from Different Clinical Specimens and Their Sensibility Against Bioactive Molecules Produced by Actinobacteria. Arab J Sci Eng .2019; 44:6267–6275.

27. World Health Organization. Antibiotic resistance. 2018.

28. Maragakis L L, Perencevich E N, Cosgrove S E. Clinical and economic burden of antimicrobial resistance. Expert Rev Anti-Infect Ther. 2008; 6:751–63.

29. Nathwani D, Raman G, Sulham K, Gavaghan M, Menon V. Clinical and economic consequences of hospital-acquired resistant and multidrug resistant Pseudomonas aeruginosa infections: a systematic review and meta-analysis. Antimicrob Resist Infect Control. 2014; 3:32.

30. Founou R C, Founou L L, Essack S Y. Clinical and economic impact of antibiotic resistance in developing countries: a systematic review and metaanalysis. PLoS One. 2017;12: e189621.

31. Giske C G, Monnet D L, Cars O, Carmeli Y. Clinical and economic impact of common multidrug-resistant gram-negative bacilli. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52:813–21.

32. Prestinaci F, Pezzotti P, Pantosti A. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. Pathog Glob Health. 2015;109(7):309-318.

33. Mirzaei B, Bazgir Z N, Goli H G, Iranpour F, Mohammadi F, Babaei A. (MDR) and extensively drug-resistant (XDR) phenotypes of Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii isolated in clinical samples from Northeast of Iran. BMC Res Notes. 2020; 13:380

34. Hatami R. The frequency of multidrug-resistance and extensively drugresistant Acinetobacter baumannii in west of Iran. J Clin Microbiol Infect Dis. 2018; 2:1.

35. El-Sayed Ahmed M A E, Zhong L, Shen C, Yang Y, Doi Y, Tian G. Colistin and its role in the Era of antibiotic resistance: an extended review (2000–2019). Emerg Microbes Infect. 2020; 9(1): 868–885.

36. Meshkat Z, Salimizand H, Amini Y, Khakshoor M, Mansouri D, Farsiani H, Ghazvini K, Najafi A. Molecular characterization and genetic relatedness of clinically Acinetobacter baumanii isolates conferring increased resistance to the first and second generations of tetracyclines in Iran. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2017;16(1):51.

37. Rafei R, Dabboussi F, Hamze M, Eveillard M, Lemarié C, Gaultier MP, Mallat H, Moghnieh R, Husni-Samaha R, Joly-Guillou ML, Kempf M. Molecular analysis of Acinetobacter baumannii strains isolated in Lebanon using four different typing methods. PLoS One. 2014;9 (12): e115969.

38. Towner KJ, Levi K, Vlassiadi M; ARPAC Steering Group. Genetic diversity of carbapenem-resistant isolates of Acinetobacter baumannii in Europe. Clin Microbiol Infect. 2008;14(2):161-7.

39. Andriamanantena TS, Ratsima E, Rakotonirina HC, Randrianirina F, Ramparany L, Carod J-F, Richard V, Talarmin A.Dissemination of multidrug resistant Acinetobacter baumannii in various hospitals of Antananarivo Madagascar. Ann clin microbiol antimicrob. 2010; Dec;9 (1):17.