Journal of Microbial World
Volume 14, No. 3, December 2021

Original Article

The Prevalence of Acinetobacter baumannii strains carrying LPS and siderophore virulence genes isolated from clinical samples

Sheida Beiranvand [1], Abbas Doosti [2], Seyed Abbas Mirzaei [3,4]

[1] Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran. [2] Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran. [3] Cellular and Molecular Research Center, Institute of Basic Health Sciences, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran. [4] Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Increasing antibiotic resistance in Acinetobacter baumannii isolates has become a major global concern today. The mechanism of the food supply through iron supply through Siderophores is one of the most important factors in the adaptation of bacteria to adverse conditions. The study of the frequency of the presence of Siderophore genes in clinical isolates provides a high understanding of the mechanism of bacterial resistance. Therefore, in this study, we investigated the frequency of antibiotic resistance in isolates containing the Siderophore gene.

Materials & Methods: Clinical samples were collected from hospitalized patients including respiratory, wound, urinary, and blood samples. Biochemical tests were performed to isolate the bacteria. A molecular sensitive polymerase chain reaction (PCR) test was performed to confirm Acinetobacter baumannii strains and to evaluate the presence of target genes. Microbial susceptibility testing was performed by disk diffusion method according to CLSI instructions and the relationship between microbial resistance and expression of Siderophore genes in isolates was investigated.

Results: According to PCR results, out of 64 isolates identified by biochemical tests, 28 isolates (43.75%) were identified as Acinetobacter baumannii. All 28 isolated isolates (100%) had LPS genes and 15 isolates (53.57%) had Siderophore gene with 93.3% resistance to Carbapenems and 26.6% to Colistin sulfate and antibiotics. Were identified as XDR and MDR strains.

Conclusion: Antibiotic resistance and the prevalence of Siderophore and LPS genes in Acinetobacter baumannii strains are worrisome and require infection control measures including management of antibiotics and rapid identification of resistant isolates.

Keywords: Siderophore, LPS, Acinetobacter baumannii, Antibiotic resistance.

Received: 11 June 2021 Revised: 16 September 2021 Accepted: 30 October 2021

Correspondence to: Abbas Doosti
Tel: +98 09133838830
E-mail: abbasdoosti@yahoo.com

Journal of Microbial World 2021, 14(3): 26-36
DOI: 10.30495/jmw.2021.690443

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 سوم (پیاپی ٤٨) پاییز ١٤٠٠
صفحات ٣٦-٢٦

Original Article

بررسی فراوانی سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* حامل ژن‌های ویرولانس LPS و سیدروفور جدا شده از نمونه‌های بالینی

شیدا بیرانوند [١]، عباس دوستی [٢*]، سیدعباس میرزایی [٣،٤]

[١] دانشجوی دکتری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاداسلامی، شهرکرد، ایران. [٢] دانشیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران. [٣] دانشیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، انستیتوی علوم پایه بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران. [٤] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاداسلامی، شهرکرد، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: امروزه افزایش میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در جدایه‌های اسینتوباکتر بومانی به نگرانی عمده جهانی تبدیل شده است. مکانیسم تامین مواد غذایی به واسطه تامین آهن از طریق سیدروفورها از مهمترین عوامل سازگاری کننده باکتری با شرایط نامساعد می‌باشد. بررسی فراوانی حضور ژن‌های سیدروفور در جدایه‌های بالینی درک بالایی از مکانیسم مقاومت باکتری را فراهم می‌کند. از این رو در این مطالعه فراوانی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های دارای ژن سیدروفور بررسی شد.

مواد و روش‌ها: نمونه‌های بالینی از بیماران بستری شامل نمونه‌های تنفسی، زخم، ادرار و خون جمع‌آوری شد. آزمون‌های بیوشیمیایی برای جداسازی باکتری و آزمون مولکولی PCR برای تایید سویه‌های اسینتوباکتر بومانی و بررسی حضور ژن‌های هدف انجام شد. تست حساسیت میکروبی به روش دیسک دیفیوژن مطابق با دستورالعمل CLSI انجام و ارتباط بین مقاومت میکروبی با بیان ژن‌های *سیدروفور* در جدایه‌ها بررسی شد.

یافته‌ها: مطابق با نتایج PCR، از ٦٤ جدایه شناسایی شده به وسیله آزمون‌های بیوشیمیایی، ٢٨ مورد (٤٣/٧٥٪) به عنوان اسینتوباکتر بومانی شناسایی شد. تمام ٢٨ جدایه (١٠٠٪) دارای ژن‌های LPS ، و ١٥ جدایه (٥٣/٥٧٪) دارای ژن سیدروفور بودند که با ٩٣/٣٪ مقاومت به کاربانم‌ها و ٢٦/٦٪ به کلیستین سولفات و انواع آنتی‌بیوتیک‌ها به عنوان سویه‌های XDR و MDR شناسایی شدند.

نتیجه گیری: مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها و شیوع ژن‌های سیدروفور و LPS در سویه‌های اسینتوباکتر بومانی نگران کننده است و نیاز به اقدامات کنترل عفونت از جمله مدیریت مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و شناسایی سریع جدایه‌های مقاوم می‌باشد.

واژگان کلیدی: سیدروفور، LPS، اسینتوباکتر بومانی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی.

دریافت مقاله: ١٤٠٠/٣/٢١ ویرایش مقاله: ١٤٠٠/٦/٢٥ پذیرش مقاله: ١٤٠٠/٨/٨

مقدمه

اسینتوباکتر (Acinetobacter) یک عامل بیماری‌زای دستگاه تنفسی است که به یک پاتوژن عمده بیمارستانی تبدیل شده است. مهمترین باکتری این گونه *اسینتوباکتر بومانی* می‌باشد که پاتوژنی فرصت طلب بوده و به صورت کوکوباسیل‌های گرم منفی، هوازی، غیرتخمیری و اکسیداز منفی یافت می‌شود (١). این باکتری در سال‌های اخیر، به عنوان شایع‌ترین عامل عفونت‌های بیمارستانی مقاوم به دارو، موجب عفونت‌های

*) آدرس برای مکاتبه: مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
تلفن: ٠٩١٣٣٨٣٨٨٣٠ پست الکترونیک: abbasdoosti@yahoo.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.

مختلفی نظیر: پنومونی وابسته به ونتیلاتور(VAP)، عفونت دستگاه ادراری (UTI)، عفونت زخم، باکتریمی و مننژیت به ویژه در بیماران بستری در بخش ICU و بیمارانی که به مدت طولانی در بیمارستان بستری بوده‌اند، شده است (۲). لیپوپلی ساکارید (LPS)بیرونی‌ترین لایه غشای این باکتری است. وجود LPS از ورود مولکول‌های کوچک آبگریز مانند آنتی‌بیوتیک به سلول جلوگیری می‌کند. LPS توسط یک مجموعه دو پروتینی به نام LptD/E به غشای خارجی باکتری منتقل می‌شود (۳). Hicks و همکاران (۲۰۲۰) مبانی ساختاری فعالیت سیستم حمل و نقل لیپوپلی ساکارید باکتریایی را بررسی کردند. یافته‌های این بررسی عملکرد ساختاری مکانیسم زیر واحدهای حمل و نقل LPS، از جمله مکانیسم جدید ABC و دخالت زیرواحد LptD/E، در انتقال LPS به غشای خارجی باکتری را روشن کرد (۳). همچنین باکتری‌ها برای برآوردن نیاز غذایی و غلبه بر محدودیت غذایی، توسط مسیرهای مختلف از منابع مختلف آهن استفاده می‌کنند که شامل پروتین‌های میزبان ترانسفرین و لاکتوفرین، هم و کلاتورهای آهن با وزن مولکولی پایین (که سیدروفر نامیده می‌شوند) است (٤). پروتین Pfsr در سیستم سیدروفور یکی از جدیدترین کاندیدهای شناخته شده جذب آهن می‌باشد. شناسایی فراوانی ژن‌های بیان کننده این پروتین‌ها در جدایه‌های بالینی *اسینتوباکتر بومانی* می‌تواند به عنوان عامل کلیدی در کنترل عفونت‌های این باکتری محسوب شود (۵). Golonka و همکاران (۲۰۲۰) در مطالعه‌ای، جنگ آهن بین سیدروفورهای باکتریایی و ایمنی ذاتی را بررسی کردند. این گروه گیرنده‌های فرضی آهن سیدروفور را به عنوان عوامل اصلی دخیل در جذب آهن و غلبه باکتری بر سیستم ایمنی بدن معرفی کردند (۵). امروزه مقاومت چندداروی به علت استفاده بی‌رویه از داروهای ضدمیکروبی گسترش فراوانی یافته است (٦). علاوه بر این آنتی‌بیوتیک‌ها گاهی اوقات با اثرات نامطلوب بر میزبان از جمله حساسیت بالا، سرکوب سیستم ایمنی و واکنش‌های آلرژیک همراه می‌باشند (۷). مقاومت به آنتی‌بیوتیک پتانسیلی می‌باشد که باکتری برای زنده ماندن در حضور آنتی‌بیوتیک‌ها از خود نشان می‌دهد (۸). ظهور سریع مقاومت باکتریایی در سراسر جهان باعث شده تا تاثیر آنتی‌بیوتیک‌ها بر عوامل بیماری‌زا کمتر گردد و خطرات فراوانی را برای بیماران در بر داشته باشد (۹). سویه‌های باکتریایی مقاوم به دارو از عوامل مهم عفونت‌های بیمارستانی به شمار می‌آیند. عفونت‌های بیمارستانی به سختی درمان می‌شوند و گاهی منجر به مرگ بیماران شده و خطری در حال افزایش محسوب می‌شوند (۱۰). در حال حاضر عفونت با پاتوژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها به طورگسترده در سراسر جهان رو به افزایش است. پیشگیری از عفونت در وهله اول می‌تواند به‌طور چشمگیری میزان مقاومت را به‌وسیله حذف کردن نیاز به تجویز آنتی‌بیوتیک‌ها کاهش دهد (۱۱). برای جلوگیری از انتقال شیوع عفونت، می‌توان به شناسایی فاکتورهای بیماری‌زا اشاره کرد. در سال‌های اخیر، بسیاری از مطالعات به بررسی عفونت‌های ناشی از اسینتوباکتر پرداخته اند (۱و۱۱). گونه‌های اسینتوباکتر بر اساس چندین شخصیت فنوتیپی و شباهت در توالی ژن 16 SrRNA تعریف می‌شوند. با این حال، ژن 16 SrRNA به اندازه کافی polymorphic نیست که بتوان تمام گونه‌های اسینتوباکتر را به وضوح تشخیص داد. La Scola و همکاران در سال ۲۰۰٦ برای مشخص کردن گونه‌ها در جنس اسینتوباکتر از یک ژن RNA پلی‌مراز زیر واحد بتا (rpoB) استفاده کردند. این گروه، قسمت‌های مشترک ژن rpoB و توالی‌های فاصله دهنده (rplL-rpoB) و (rpoB-rpoC) از ۱۷ سویه استاندارد از گونه اسینتوباکتر و ۷ سویه بالینی را انتخاب کرده و آغازگر را طراحی نمودند. در نهایت ۲۱ جدایه بالینی *اسینتوباکتر بومانی* را برای روابط درون گونه‌ای مورد آزمایش قرار دادند و با مقایسه توالی‌های جزئی ژن rpoB و فاصله دهنده‌های جانبی آن نسبت به ژن 16 SrRNA، نتایج بهتری به دست آوردند (۱۲). از آنجایی که امکان دخالت ژن‌های مرتبط با آهن در تامین مواد غذایی مورد نیاز *اسینتوباکتر بومانی* در شرایط نامساعد و ایجاد مقاومت در این باکتری وجود دارد، آگاهی از فراوانی سویه‌های دارای ژن‌های سیدروفور و ارتباط آن با الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌تواند منجر به استفاده از روش‌هایی برای پیشگیری از انتشار این باکتری‌ها در محیط

بیمارستان گردد. لذا در این مطالعه فراوانی ژن‌های بیماری‌زا LPS و سیدروفور ررسی شد.

مواد و روش‌ها

الف) جمع‌آوری نمونه، جداسازی و شناسایی باکتری: ۲۰۰ نمونه بالینی از آزمایشگاه‌های بیمارستان‌های اصفهان که مربوط به بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه (ICU) بودند، جمع‌آوری شد. پس از انتقال نمونه‌های بالینی شامل نمونه‌های تنفسی، زخم، ادرار و خون به آزمایشگاه، نمونه‌ها کشت داده شده و جدایه‌ها به روش بیوشیمیایی تعیین هویت شدند. به این صورت که ابتدا نمونه‌ها روی دو محیط بلاد آگار و مک کانکی آگار کشت داده و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. مک کانکی آگار محیط کشت اختصاصی باکتری‌های گرم منفی می‌باشد؛ به این ترتیب مانع از رشد باکتری‌های گرم مثبت می‌شود. کلنی‌های باکتریایی رشد یافته روی سطح پلیت‌های کشت به روش رنگ آمیزی گرم بررسی شدند. برای تهیه استوک از باکتری‌های گرم منفی جداسازی شده، محیط کشت نوترینت آگار در لوله‌های آزمایش در پیچدار به صورت شیبدار تهیه و هر جدایه در لوله ای کشت داده شد. بعد از رشد ۲۴ ساعته، جدایه‌ها در یخچال در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند.

ب) شناسایی بیوشیمیایی اسینتوباکتر بومانی: شناسایی جنس *اسینتوباکتر بومانی* با استفاده از کشت در محیط‌های SIM، TSI، سیمون سیترات و تست‌های رنگ آمیزی گرم، کاتالاز، اکسیداز، احیای نیترات و هیدرولیز اسکولین در محیط کشت بایل اسکولین آگار انجام شد.

از سویه‌های استاندارد باکتریایی (IBRC-M 10690) *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 و *Pseudomonas aeroginosa* ATCC 9027 (IBRC-M 10205) به ترتیب به عنوان کنترل مثبت برای تست های کاتالاز و اکسیداز استفاده شد. همچنین سویه *Streptococcus. Pyogenes* ATCC 19615 (IBRC-M 11250) به عنوان کنترل منفی برای تست کاتالاز مورد استفاده قرار گرفت.

ج) شناسایی مولکولی اسینتوباکتر بومانی: از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) برای شناسایی مولکولی *اسینتوباکتر بومانی* استفاده شد. برای این منظور، پس از بررسی منابعی که از PCR برای تشخیص *اسینتوباکتر بومانی* استفاده کرده بودند، آغازگرهای مربوط به ژن rpoB، بر اساس طراحی La Scola و همکاران (۲۰۰۶)، برحسب میزان اختصاصیت آغازگرها و نتایج آنالیز با نرم افزار BLAST به عنوان آغازگر اختصاصی انتخاب شد (۱۲)، (جدول ۱). مطابق با نتایج گروه La Scola و همکاران آغازگر طراحی شده ژن rpoB نسبت به SrRNA 16 اختصاصیت بالاتری در تشخیص *اسینتوباکتر بومانی* دارد (۱۲). سپس استخراج DNA به روش فنل-کلروفرم، با اندکی تغییر مطابق با پروتکل Piri Gharaghieو همکاران (۲۰۱۸) انجام شد (۱۳). برای این منظور ابتدا به کمک سانتریفیوژ (rpm-13000 به مدت ۳ دقیقه) از باکتری‌ها رسوب تهیه، سپس محلول رویی دور ریخته شده و ۱۰۰ میکرولیتر محلول ترکیبی شامل تریس-اسیدکلریدریک ۱۰ میلی‌مولار، سدیم کلرید ۱۰۰میلی‌مولار، EDTA 1 میلی‌مولار و ۰/۱ درصد وزنی حجمی SDS به رسوب باکتری اضافه شد. سپس به میزان۲۰ میکرولیتر محلول TE با pH 7.6 به آن اضافه و رسوب به آرامی در محلول حل شد. پس از آن سه میکرولیتر لیزوزوم-mg/Ml 20 اضافه و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد. سپس ۳۰ میکرولیتر از غلظت ۱۰ میلی مولار پروتئیناز K به میکروتیوب افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۶ درجه سلسیوس در بن ماری قرار داده شد. سپس فنل و کلروفرم به نسبت ۱:۱ (۲۵۰ میکرولیتر: ۲۵۰ میکرولیتر) به میکروتیوب اضافه و به مدت پنج دقیقه در دور rpm -13000 سانتریفیوژ شد. فاز رویی حاوی DNA بوده و به آرامی جدا و به ویال دیگری انتقال داده شد. ۰/۱ حجم جدا شده استات سدیم ۳ مولار و ۲/۵برابر حجم جدا شده اتانول مطلق اضافه گردید. ویال‌ها چند بار به آرامی برعکس شد و به مدت پنج دقیقه در rpm-13000سانتریفیوژ گردید. سپس محلول رویی دور ریخته شد و ویال‌ها در دمای اتاق قرار داده شدند تا کامل خشک شوند. در انتها به ویال‌ها به میزان ۱۰۰ میکرولیتر آب

دوبار تقطیر اضافه و کیفیت DNA استخراج شده به کمک دستگاه نانودراپ NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, USA) سنجیده شده و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. آغازگرهای مورد استفاده در واکنش PCR از شرکت سیناکلون (ایران) تهیه شدند. سپس واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰میکرولیتر مسترمیکس (x2 یکتا تجهیز آزما، ایران)،۱ میکرولیتر از آغازگر فوروارد (10 pmol/ul)، ۱ میکرولیتر از آغازگر ریوارد (10 pmol/ul)، ۳ میکرولیتر DNA (30 ng/ul) و ۵ میکرولیتر آب مقطر در نظر گرفته شد. برنامه دمایی و زمانی شامل، واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، واسرشت در دمای ۹٤ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، اتصال مطابق با دمای ذکر شده در جدول ۱ برای هر آغازگر به مدت ٤۰ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و تکرار مراحل ۲ تا ٤ به تعداد ۳۰ چرخه و گسترش نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه بود. پس از پایان واکنش، محصول توسط ژل آگارز ۱٪ در دمای اتاق الکتروفورز گردید.

د) تایید حضور و بررسی فراوانی ژن‌های LPS و سیدروفور در جدایه‌ها: شناسایی مولکولی ژن‌های LPS و سیدروفور مطابق با پروتکل تشریح شده، با استفاده از روش PCR صورت گرفت. محصولات PCR روی ژل آگارز ۱٪ با بافر Tris-borate EDTA (TBE) الکتروفورز شده و سپس ژل توسط 0.15 µg/ml اتیدیوم برماید رنگ شده و با دستگاه Geldoc مدل BTS-20.MS (Uvitec, EEC) در طول موج ۲۸۰ نانومتر از نظر وجود باندهای هدف در کنار مارکر مولکولی و کنترل مثبت *اسینتوباکتر بومانی* ATCC BAA-747 (IBRC-M 10654) مورد بررسی قرار گرفت.

ه) بررسی میزان حساسیت آنتی‌بیوتیکی: برای این منظور جدایه‌های *اسینتوباکتر بومانی* بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شدند. مقاومت دارویی سویه‌های جدا شده نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ایمی پنم (IMP: 10µg)، مروپنم (MEM: 10µg)، جنتامایسین (GEN: 10µg)، آمیکاسین (AK: 10µg)، پیپراسیلین (PIP: 100µg)، پیپراسیلین- تازوباکتام (PIT: 10µg)، سفپیم (FEP: 30µg)، سفوتاکسیم (CTX: 10µg)، سیپروفلوکساسین (CIP: 5µg) و کلیستین سولفات (CT: 10µg) (Mast, United Kingdom) مطابق با پروتکل‌های CLSI به روش انتشار از دیسک بررسی شد. از سویه *Escherichia coli* ATCC 8739 به عنوان کنترل کیفی دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی استفاده گردید.

و) بررسی ارتباط بین مقاومت آنتی‌بیوتیکی با فراوانی ژن‌های LPS و سیدروفور: برای این منظور درصد حضور هر کدام از ژن‌ها در سویه‌های مقاوم به انواع کلاس‌های آنتی‌بیوتیکی محاسبه شد.

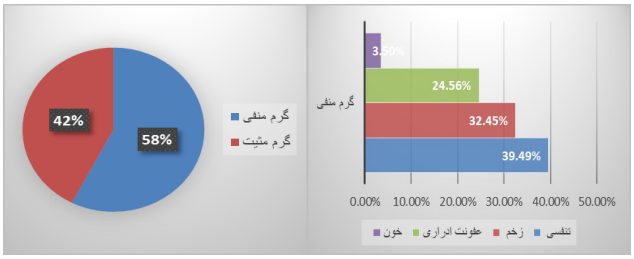
ی) آنالیز آماری: داده‌های آماری توسط نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ و با استفاده از آمار توصیفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

جدول ۱: توالی آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش.

مکانیسم	نام ژن	سکانس آغازگر	اندازه (bp)	دمای اتصال (C)
جنس	*rpoB*	F: 5'-TAYCGYAAAGAYTTGAAAGAAG-3' R: 5'- CMACACCYTTGTTMCCRTGA-3'	350	60
سیدروفور	*Pfsr*	F: 5'- ATGAGCGCCCGGTACAAGT -3' R: 5'- GTAATTGAACTTCACTGTGAAAT -3'	289	57
LPS	*LptD*	F: 5'- CCTCGTAAAGAATCCCTCGAG-3' R: 5'- CCCAGTTTATGGATATGTAATCTGC -3'	180	57
LPS	*Lpt E*	F: 5'- ATGCACCTGGCCCAGAGGCTG -3' R: 5'- TCAGGGCTGGGCTTTGGGCAG -3'	510	60

یافته‌ها

الف) جداسازی و شناسایی باکتری ها: پس از جمع‌آوری نمونه‌های بالینی و کشت اولیه، از مجموع ۲۰۰ نمونه ۸٦ جدایه (٤۲٪) به عنوان باکتری های گرم مثبت و ۱۱٤ جدایه (۵۸٪) باکتری‌های گرم منفی تشخیص داده شدند. پراکندگی باکتری‌های گرم منفی در نمونه‌های تنفسی ۳۹/٤۹٪ (٤۵ نفر)، ترشحات زخم ۳۲/٤۵٪ (۳۷ نفر)، عفونت‌های دستگاه ادراری ۲٤/۵٦٪ (۲۸ نفر) و خون ۳/۵٪ (٤ نفر) بود که تعداد ٦٦ بیمار (۵۷/۸۹٪) مونث و ٤۸ بیمار (٤۲/۱۱٪) مذکر بودند. میانگین سنی بیماران ۵۱/۳ سال با دامنه ۲٤ تا ۸۷ سال بود.



شکل ۱: پراکندگی باکتری‌های گرم منفی در نمونه های بالینی جمع‌آوری شده. تراکم باکتری‌های گرم منفی در نمونه‌های بالینی ۵۸٪ بود. بیشترین تراکم باکتری‌های گرم منفی (۴۹/۳۹ ٪) مربوط به نمونه‌های تنفسی و کمترین تراکم آن مربوط به نمونه‌های خون (۵۰/۳ ٪) بود.

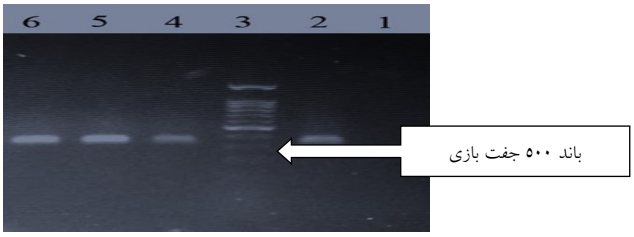
سپس برای جداسازی و شناسایی *اسینتوباکتر بومانی* از سایر باکتری‌های گرم منفی تست‌های بیوشیمیایی انجام شد. از مجموع ۱۱۴ باکتری گرم منفی، ٦٤ جدایه (٥٦/١٤٪) کاتالاز مثبت و اکسیداز منفی بودند (جدول ۲). واکنش اندول در این باکتری‌ها منفی بوده و توانایی تولید گاز H2S نداشتند. باکتری‌های دیگر که فاقد این خصوصیات بودند، در این مرحله حذف شدند.

ب) شناسایی مولکولی اسینتوباکتر بومانی: آزمون PCR برای شناسایی جنس *اسینتوباکتر بومانی* با استفاده از آغازگر *rpoB* با اندازه باند ۳۵۰ جفت باز انجام شد. از ٦٤ جدایه شناسایی شده به وسیله آزمون‌های بیوشیمیایی ۲۸ جدایه (٤٣/٧٥٪) به عنوان *اسینتوباکتر بومانی* شناسایی و باکتری‌های دیگر از ادامه مراحل کنار گذاشته شدند.

ج) فراوانی ژن‌های LPS و سیدروفور در جدایه‌ها: با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (جدول ۱) حضور ژن‌های LPS و سیدروفور در جدایه‌های *اسینتوباکتر بومانی* بررسی شد. مطابق با شکل ۳، تعداد ۱۵ جدایه (٥٣/٥٧٪) دارای ژن بیماری‌زا سیدروفور بودند که نقش اساسی در تامین آهن مورد نیاز

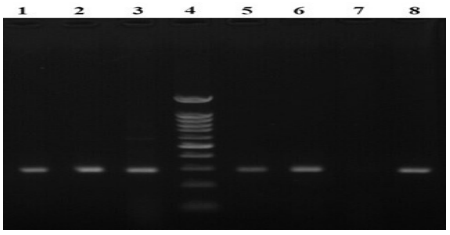
جدول ۲: نتایج آزمون های افتراقی و بیوشیمیایی *اسینتوباکتر بومانی*.

نوع تست	SIM	گرم	سیمون سیترات	TSI	MR	کاتالاز	هیدرولیز اسکولین	اکسیداز
تعداد ٦٤ نمونه	–	–	+	K/K	–	+	+	–
تعداد ۲۷ نمونه	+	–	+	K/K	–	–	+	–
تعداد ۲۳ نمونه	–	–	–	K/K	+	+	–	+
ATCC BAA-747	–	–	+	K/K	–	+	+	–

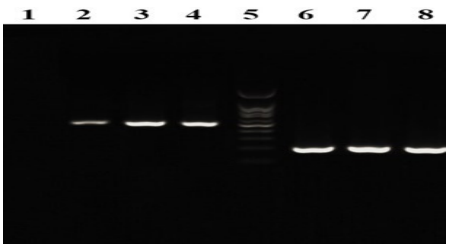


شکل ۲: نتایج آزمون PCR برای شناسایی جنس *اسینتوباکتر بومانی*
۱: نمونه کنترل منفی، ۲: کنترل مثبت (ATCC BAA-747) با باند ۳۵۰، ۳: DNA Ladder 100bp، ٤و٥ و٦: نمونه‌های *اسینتوباکتر بومانی* با باند ۳۵۰.

باکتری دارد. همچنین تمام ۲۸ جدایه (۱۰۰٪) دارای باند ۵۱۰ و ۱۸۰ جفت بازی بودند که به ترتیب تایید کننده حضور ژن‌های *LptE* و *LptD* (*LPS*) بود (شکل ٤).



شکل ۳: تایید حضور ژن *سیدروفور* با باند ۲۸۹جفت بازی در جدایه‌های *اسینتوباکتر بومانی*. ۱، ۲، ۳، ۵ و ٦: نمونه‌های *اسینتوباکتر بومانی* با باند ۲۸۹ جفت باز. ٤: DNA Ladder 100bp. ۷: کنترل منفی. ۸: کنترل مثبت (*اسینتوباکتر بومانی* ATCC BAA-747) با باند ۲۸۹ جفت بازی.



شکل ٤: تایید حضور ژن *LptD* و *LptE* (*LPS*) به ترتیب با باندهای ۱۸۰ و ۵۱۰ جفت بازی در جدایه‌های *اسینتوباکتر بومانی*. ۱: کنترل منفی. ۲، ۳ و ٤: ژن *LptE* با باند ۵۱۰ جفت باز در *اسینتوباکتر بومانی*. ۵: DNA Ladder 100bp. ٦، ۷ و ۸: وجود ژن *LptD* با باند ۱۸۰ جفت باز در *اسینتوباکتر بومانی*.

د) نتایج حساسیت آنتی‌بیوتیکی و ارتباط آن با وجود ژن‌های LPS و سیدروفور: در بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها نتایج مشخص نمودند که هر ۲۸ جدایه مورد نظر حداقل به سه کلاس آنتی‌بیوتیکی مقاوم بودند که نشان دهنده چند-مقاومتی یا MDR بودن جدایه‌ها می‌باشد. در حالی که بیشتر جدایه‌ها (۹۷٪) حداقل به سه کلاس از داروهای ضد میکروبی مقاوم بودند، تقریباً ۱۰۰ درصد جدایه‌ها در برابر حداقل ۱ آنتی‌بیوتیک آزمایش شده مقاوم بودند. مقاومت بالایی به سفپیم (۹۶/٤٪)، گروه پنی‌سیلین‌ها (۸۲/۱٤٪) و گروه آمینوگلیکوزیدها (٦٤/۲۸٪) مشاهده شد. پروفایل مقاومتی جدایه‌ها در در جدول ۳ آورده شده است. بیشترین و کمترین نمونه‌های MDR به ترتیب نمونه‌های تنفسی و خون بودند.

وجود ژن‌های *LptD/E* در تمام ۲۸ جدایه به عنوان منابع سازنده *LPS* به عنوان فاکتور ویرولانس *اسینتوباکتر بومانی* رابطه مستقیمی با بروز فنوتیپ MDR در باکتری دارد. به طوری که تمام جدایه‌های دارای ژن‌های *LptD/E* فنوتیپ MDR را بروز دادند.

در این مطالعه ارتباط بین حضور ژن‌های *سیدروفور*، *LPS* و حساسیت میکروبی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های استفاده شده، مورد ارزیابی قرار گرفت. ارتباط آماری بین جدایه‌های *اسینتوباکتر بومانی* حامل ژن *سیدروفور* با مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدول ٤ آورده شده است. بین حضور ژن *سیدروفور* و گروه‌های آنتی‌بیوتیکی مورد استفاده از لحاظ آماری ارتباط معنی‌دار وجود دارد ($p<0.05$). علاوه بر آن از مجموع ۲۸ جدایه ۱۳ جدایه (٤٦/٤۲٪) نسبت به کاربانپم‌ها (مروپنم و ایمی پنم) دارای حساسیت بودند. این ۱۳ جدایه فاقد ژن *سیدروفور* بودند. بنابراین ۱۵ جدایه باقی مانده (۵۳/۵۷٪) به عنوان سویه‌های XDR در نظر گرفته شدند.

در بررسی فراوانی و ارتباط آماری بین سویه‌های MDR و XDR با ژن *سیدروفور* و *LPS* مشخص شد که رابطه مستقیم بین فنوتیپ MDR و ژن‌های *LPS* وجود دارد. همچنین مشخص شد که بین ژن *سیدروفور* و فنوتیپ XDR در جدایه‌های *اسینتوباکتر بومانی* همبستگی وجود دارد؛ به گونه‌ای

جدول ۳: مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *اسینتوباکتر بومانی*.

آنتی‌بیوتیک	حساس	حدواسط	مقاوم
ایمی پنم	۱۲(٪٤۲/۸۵)	۰	۱٦(٪۵۷/۱٤)
مروپنم	۱٤(٪۵۰)	۰	۱٤(٪۵۰)
سفپیم	۰	۱(٪۳/۵)	۲۷ (٪۹٦/٤)
سفوتاکسیم	۱۱(٪۳۹/۲۸)	۰	۱۷ (٪٦۰/۷۱)
پیپراسیلین- تازوباکتام	۲(٪۷/۱٤)	۳(٪۱۰/۷)	۲۳ (٪۸۲/۱٤)
پیپراسیلین	۳(٪۱۰/۷)	۲(٪۷/۱٤)	۲۳ (٪۸۲/۱٤)
سیپروفلوکساسین	۱٤(٪۵۰)	۰	۱٤ (٪۵۰)
آمیکاسین	۷ (٪۲۵)	٤(٪۱٤/۲۸)	۱۷ (٪٦۰/۷۱)
جنتامایسین	۸(٪۲۸/۵)	۱(٪۳/۵)	۱۹ (٪٦۷/۸۵)
کلیستین سولفات	۱۹(٪٦۷/۸۵)	۵(٪۱۷/۸۵)	٤(٪۱٤/۲۸)

جدول ٤: ارتباط بین فراوانی ژن *سیدروفور* و مقاومت آنتی‌بیوتیکی.

کلاس آنتی‌بیوتیکی	آنتی بیوتیک	فراوانی مقاومت دارای ژن *سیدروفور*	مقاوم	فراوانی حساسیت دارای ژن *سیدروفور*
کاربانپم	ایمی پنم و مروپنم	۱٤ (٪۹۳/۳)	۱٦(٪۵۷/۱٤)	۱(٪٦/٦)
پنی سیلین+ مهارکننده	پیپراسیلین- تازوباکتام	۱۵ (٪۱۰۰)	۱٤(٪۵۰)	۰
سفالوسپورین	سفوتاکسیم و سفپیم	۱۵ (٪۱۰۰)	۲۷ (٪۹٦/٤)	۰
پنی سیلین	پیپراسیلین	۱۵ (٪۱۰۰)	۱۷ (٪٦۰/۷۱)	۰
فلوروکینولون	سیپروفلو کساسین	۱٤ (٪۹۳/۳)	۲۳ (٪۸۲/۱٤)	۱(٪٦/٦)
آمینوگلیکوزید	آمیکاسین و جنتامایسین	۱۳ (٪۸٦/٦)	۲۳ (٪۸۲/۱٤)	۲(٪۳/۱۳)
کلیستین	کلیستین سولفات	٤ (٪۲٦/٦)	۱٤ (٪۵۰)	۱۱(٪۳/۷۳)

۹۳/۳٪ جدایه‌هایی که دارای ژن *سیدروفور* بودند به کاربانپم‌ها (ایمی پنم و مروپنم) مقاوم بودند. از طرفی ۲٦/٦٪ از جدایه‌های دارای ژن *سیدروفور* نسبت به کلیستین سولفات مقاومت نشان دادند. این نتایج نشان دهنده تاثیر ژن *سیدروفور* در سازگاری جدایه‌های بالینی *اسینتوباکتر بومانی* با شرایط نامساعد و بروز فنوتیپ مقاومت می‌باشد.

بحث

امروزه مقاومت چند دارویی به علت استفاده بی‌رویه از داروهای ضد میکروبی گسترش فراوانی یافته است. علاوه بر این مشکل، آنتی‌بیوتیک‌ها گاهی اوقات با اثرات نامطلوب بر میزبان از جمله حساسیت بالا، سرکوب سیستم ایمنی و

واکنش‌های آلرژیک همراه هستند (۱۴و۲۴). در حال حاضر انتشار پاتوژن‌های مقاوم به چند دارو در محیط‌های بیمارستانی بسیار گسترده و میزان آن در بسیاری از کشورها در حال افزایش می‌باشد. در حال حاضر این مساله یک تهدید جهانی جدی به شمار می‌رود. در میان این پاتوژن‌ها، *اسینتوباکتر بومانی* باکتری است که تقریبا در همه جا می‌تواند حضور داشته باشد. این کوکوباسیل غیر تخمیرکننده به عنوان یکی از عوامل اصلی عفونت‌های بیمارستانی بخصوص در بخش مراقبت ویژه (ICU) مشاهده می‌شود (۱۵و۲۵). از این رو امروزه محققان از طریق روش‌های بررسی حساسیت ضدمیکروبی به طور گسترده‌ای در حال مبارزه علیه این عوامل می‌باشند. تست حساسیت ضدمیکروبی (آنتی‌بیوتیکی) می‌تواند برای اپیدمیولوژی و پیش‌بینی نتایج درمانی استفاده شود (۱۶). بیماران بستری به مدت طولانی در بخش‌های ICU دارای میزان بالایی از عفونت بخصوص عفونت‌های *استافیلوکوکی*، *اسینتوباکتریایی*، *سودوموناسی* و *کاندیدایی* می باشند. در مطالعه انجام شده در سال ۲۰۰۹ ، ۵۱٪ از بیمارانی که در بیمارستان بستری بودند دچار عفونت بیمارستانی شدند. از میان این افراد ۷۱٪ آن‌ها به علل مختلف دچار مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها شدند. ٦٤٪ از این عفونت‌ها مربوط به ناحیه تنفسی بود که پس از جداسازی باکتری‌ها مشخص گردید؛ ٦٢٪ باکتری گرم منفی و ٤٧٪ آن‌ها گرم مثبت بودند (۱۷). در این مطالعه مشاهده شد که در میان جدایه‌های بالینی، بیشترین میزان عفونت مربوط به آلودگی با باکتری گرم منفی می‌باشد و در بین باکتری‌های گرم منفی جنس اسینتوباکتر با فراوانی ٥٦/١٤ ٪ بیشترین فراوانی را دارا بود. از طرفی ۵۱٪ باکتری‌های گرم منفی جداسازی شده مربوط به نمونه‌های تنفسی بودند. به دلیل افزایش عفونت‌های مقاوم به دارو، سازمان سلامت جهانی برای ایجاد راه حل‌ها و درمان‌های ضدمیکروبی جدید به منظور کاهش سویه‌های مقاوم در تلاش است. از این رو شناسایی فنوتیپ‌های مقاومت و ژن‌های دخیل در افزایش پایداری باکتری حایز اهمیت است (۱۸). در مطالعه حاضر که فراوانی فنوتیپ‌ها و ژن‌های *سیدروفور* و *LPS* در جدایه‌های بالینی *اسینتوباکتر بومانی* در بیماران بستری در بیمارستان‌های اصفهان انجام گرفت، درصد جدایه‌ها با فنوتیپ MDR و XDR به ترتیب ۹۷ درصد و ٤٦ درصد و ٥٧/١٤ درصد بود. میزان MDR در مطالعات شیرمحمدلو (۱۸) و همکاران و همچنین Simo و همکاران (۱۹) ۱۰۰ درصد گزارش شد که با مطالعه ما همخوانی کامل دارد و حاکی از بالا بودن میزان MDR جدایه‌های *اسینتوباکتر بومانی* در مناطق مختلف جهان می‌باشد.

سعیدی در سال ۲۰۱۸ فنوتیپ XDR را ۱۵/۷ درصد (۲۰) و گل افشانی در سال ۲۰۱۹ آن را ۲۲/۵ درصد (۲۱) ذکر کرده که نسبت به میزان فنوتیپ XDR در مطالعه ما بسیار پایین‌تر است. این شواهد نشان می‌دهد که با توجه به ظهور و گسترش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی امکان حضور سویه‌های XDR در سال‌های اخیر بسیار گسترش یافته است. در مطالعه پیش رو، مقاومت سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* نسبت به کلاس‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی بررسی شد و بیشترین مقاومت به سفپیم (٩٦/٤٪)، گروه پنی سیلین‌ها (٨٢/١٤٪) و گروه آمینوگلیکوزیدها (٦٤/٢٨٪) مشاهده شد و نسبت به کلسیتین (١٤/٢٨٪) کمترین بود، با این حال مقاومت *اسینتوباکتر بومانی* به گروه کاربانپم‌ها تقریبا ۵۵٪ بود. در حالی که در مطالعات پیری قراقیه و همکاران در سال ۲۰۲۰ میزان حساسیت *اسینتوباکتر بومانی* به کلیستین فقط ۱٪ گزارش شده بود (۱). بررسی این نتایج با مطالعات انجام یافته، نشان می‌دهد که الگوی مقاومت این باکتری به سمت حساسیت کمتر به آخرین آنتی‌بیوتیک‌های مصرف شده (گروه کاربانپم‌ها و کلیستین) با گذشت زمان رو به پیشرفت است. در این پژوهش آنتی‌بیوتیک کلسیتین سولفات فعالیت آنتی باکتریال بهتری نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها از خود نشان داد؛ هر چند خود نیز با مقاومت ١٤/٢٨٪ مواجه می‌باشد. کلیستین سولفات آخرین آنتی‌بیوتیک موجود برای درمان عفونت‌های ناشی از *اسینتوباکتر بومانی* مقاوم به چند دارو است که در دهه گذشته مورد توجه بسیاری قرار گرفته است.

این آنتی‌بیوتیک یک گزینه بسیار مهم درمانی برای *اسینتوباکتر بومانی* مقاوم در برابر کاربانپم‌ها بوده که با توجه به نتایج این

مطالعه باکتری *اسینتوباکتر بومانی* در حال سازگار شدن نسبت به آن می‌باشد. با افزایش ظهور مقاومت در برابر کلسیتین، گزینه‌های درمانی در برابر این پاتوژن محدودتر می‌شود. از این رو، توجه به میزان مقاومت به کلسیتین در مطالعات انجام یافته در مناطق جغرافیایی مختلف، نشان از انتشار سریع مقاومت *اسینتوباکتر بومانی* و سیر صعودی آن دارد. مطالعات ما با ۱۴/۲۸٪ مقاومت نسبت به کلیستین سولفات همسو با مطالعات وکیلی و همکاران با ۱۳٪ مقاومت نسبت به کلیستین بود (۲۲). نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که مقاومت به آنتی‌بیوتیک کلیستین سولفات با سرعت رو به افزایش می‌باشد و این نرخ بالای مقاومت می‌تواند به عنوان یک هشدار جدی در این زمینه قلمداد شود و درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری را بسیار دشوار و یا حتی غیرممکن سازد. از این رو شناسایی ژن‌های دخیل در تامین نیازهای غذایی باکتری و ارتباط آن با مقاومت و ایجاد فنوتیپ‌های مقاومت حایز اهمیت است. در این مطالعه، فراوانی ژن‌های *سیدروفور* و *LPS* به ترتیب ۵۳/۵۷٪ و ۱۰۰٪ مشاهده شد. پیری قراقیه و همکاران در سال ۲۰۱۸ فراوانی ژن مقاومت بیوفیلمی را در سویه‌های بالینی *اسینتوباکتر بومانی* بررسی کرد. مطابق با نتایج آن‌ها، ژن‌های دخیل در تشکیل بیوفیلم نقش مهمی در سازگار سازی باکتری با شرایط نامساعد دارند (۱۳). نتایج ما همسو با نتایج گروه پیری قراقیه نشان دهنده اهمیت بیان ژن‌های تامین کننده مواد غذایی (*سیدروفور*) در شرایط نامساعد و سازگار نمودن باکتری با شرایط موجود می‌باشد.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر مشخص شد که رابطه مستقیم بین فنوتیپ MDR و ژن‌های *LPS* وجود دارد. همچنین مشخص شد که بین ژن *سیدروفور* و فنوتیپ XDR در جدایه‌های *اسینتوباکتر بومانی* همبستگی وجود دارد؛ به شکلی که ۹۳/۳٪ جدایه‌هایی که دارای ژن *سیدروفور* بودند به کاربانپم‌ها (ایمی پنم و مروپنم) مقاوم بودند. از طرفی ۲۶/۶٪ از جدایه‌های دارای ژن *سیدروفور* نسبت به کلیستین سولفات مقاومت نشان دادند. این نتایج نشان دهنده تاثیر ژن *سیدروفور* در سازگاری جدایه‌های بالینی *اسینتوباکتر بومانی* با شرایط نامساعد و بروز فنوتیپ مقاومت می‌باشد. افزایش استفاده از داروهای ضد میکروبی منجر به ریشه کن کردن فلور نرمال و جایگزین شدن سویه‌های مقاوم به چند دارو می‌شود. تجویز اشتباه دارو و عدم تشخیص سویه‌های مقاوم باعث گسترش بیشتر این سویه‌ها شده است. نوع ماده ضد عفونی کننده که برای سطوح بیمارستان هم استفاده می‌شود، مهم است (۲۳) چرا که بسیاری از مواد ضدعفونی کننده از این پس بر روی سویه‌ها موثر نخواهند بود، بنابراین در انتخاب مواد ضدعفونی کننده باید دقت کرد. در این مطالعه، مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها و شیوع ژن‌های *سیدروفور* و *LPS* در سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* نگران کننده است و نیاز به اقدامات کنترل عفونت از جمله مدیریت مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و شناسایی سریع جدایه‌های مقاوم می‌باشد. این مطالعه به عنوان مطالعه‌ای پیشرو در ایران در خصوص بررسی فراوانی ژن‌های *سیدروفور* و *LPS* می‌باشد به طوریکه هنوز هم گزارشی از وجود این ژن‌ها از ایران وجود ندارد.

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 تمامی پرسنل مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد واحد شهرکرد به دلیل همکاری صمیمانه در این پژوهش کمال امتنان را دارند.

تعارض منافع

وجود ندارد.

References

1. Piri Gharaghie T, Sadat Shandiz S, and Beiranvand S. Evaluation of silver nanoparticles effects on bla-per1 gene expression for biofilm formation in isolates of antibiotic-resistant *Acientobacter Bumanni* by real time PCR method. JCMR. 2020; 16(3): 360.
2. Jafari S, Najafipour S, Kargar M, Abdollahi A, Mardaneh J, Fasihy Ramandy M, et al . Phenotypical Evaluation of Multi-Drug Resistant *Acinetobacter Baumannii*. J Fasa Univ Med Sci. 2013; 2 (4) :254-258.
3. Hicks G, Jia Z. Structural Basis for the Lipopolysaccharide Export. Lipopolysaccharides (*LPS* s). 2020; 19(1): 124.
4. Hofmann M, Heine T, Schulz V, Hofmann S, Tischler D. Draft genomes and initial characterization of siderophore producing pseudomonads isolated from mine dump and mine drainage. Biotechnol. Rep. 2020; 25(1): e00403.
5. Golonka R, San Yeoh B, Vijay-Kumar M. The iron tug-of-war between bacterial siderophores and innate immunity Innate Immun. 2019; 11(3): 249-262.
6. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey R, Carmeli Y, Falagas M, Giske C, et al. Multidrug resistant, extensively drug resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect. 2012; 18(3): 268-81.
7. Luyt C-E, Bréchot N, Trouillet J-L, Chastre J. Antibiotic stewardship in the intensive care unit. Critical care. 2014; 18(5): 480.
8. Wang S, Ma X, Liu Y, Yi X, Du G, Li J. Fate of antibiotics, antibiotic-resistant bacteria, and cell-free antibiotic-resistant genes in full-scale membrane bioreactor wastewater treatment plants. Bioresour. Technol. 2020; 30(2): 122825.
9. Lushniak BD. Antibiotic resistance: a public health crisis. *Public Health* Rep. 2014; 129(4): 314-6.
10. Tsai Y, Liou C, Lin J, Fung C, Chang F, Siu L. Effects of different mechanisms on antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii* : A strategic system for the screening and activity testing of new antibiotics. Int. J. Antimicrob. Agents. 2020 ; 33(2): 105918.
11. Luna B, Trebosc V, Lee B, Bakowski M, Ulhaq A, Yan J, et al. A nutrient-limited screen unmasks rifabutin hyperactivity for extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* . Nat. Microbiol. 2020; 5(9): 1134-1143.
12. La Scola B, Gundi VA, Khamis A, Raoult D. Sequencing of the *rpoB* gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter* species. J Clin Microbiol. 2006; 44(1): 827–32.

13. Piri Gharaghie T, Shandiz S. The Inhibitory Effects of Silver Nanoparticles on Bap Gene Expression in Antibiotic-Resistant *Acientobacter bumanni* Isolates using Real-Time PCR. J Ilam Uni Med Sci. 2018; 26(4): 175-185.
14. Garnacho-Montero J, Ortiz-Leyba C, Jimenez F, Barrero-Almodovar A, Garcia-Garmendia J, Bernabeu-Wittell M, et al. Treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia (VAP) with intravenous colistin: a comparison with imipenem-susceptible VAP. Arch clin infect dis. 2003; 36(9): 1111-8.
15. Maraki S, Mantadakis E, Mavromanolaki VE, Kofteridis DP, Samonis G. A 5-year Surveillance Study on Antimicrobial Resistance of *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates from a Tertiary Greek Hospital. J Infect Chemother. 2016; 48(3): 190-8.
16. Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. J Pharm Anal. 2016; 6(2): 71-9.
17. Vincent J-L, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, et al. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. Jama. 2009; 302(21): 2323-9.
18. Shirmohammadlou N, Zeighami H, Haghi F. Resistance Pattern And Distribution Of Carbapenemase And Antiseptic Resistance Genes Among Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolated From Intensive Care Unit Patients. J Med Microbiol. 2018; 67(10): 1467-73
19. Simo PL, Rabenandrasana MAN, Kowalewicz C. Phenotypic And Molecular Characterisations Of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Strains Isolated In Madagascar. Antimicrob Resist Infect Control. 2019; 8(1): 31.
20. Saeedi S, Abdolsalehi MR, Khodabandeh M. Survey Of Integron Types And Carbapenem Resistance Encoding Genes In *Acinetobacter baumannii* Isolated From Burn Wound Samples. Alborz Univ Med J 2018; 7(4): 323-32. (Persian)
21. Golafshani FB, Kaboosi H, Armaki MT. Molecular Investigation Of Integron Types And Imipenem-Resistance Encoded Genes In *Acinetobacter baumannii* Strains Isolated From Burns Patients In Iran. Gene Rep. 2019; 17(1): 100486.
22. Vakili B, Fazeli H, Shoaei P. Detection Of Colistin Sensitivity In Clinical Isolates Of *Acinetobacter baumannii* In Iran. J Res Med Sci. 2014; 19(1): S67-S70.
23. Haque M. Antibiotic Resistance: A Complete Trouble Maker for Healthcare System Especially among Lower and Middle-Income Countries. Adv Health Sci Educ Theory Pract. 2019; 2(4).
24. Ali Akbarzadeh, Katayoun, Farajnia, Safar, Karimi Nik, Ashraf. Prevalence of aminoglycoside resistance genes in *Acinetobacter bamani* isolated from patients in Tabriz. J World of Microbes (JMW). 2013 Oct 1; 6 (No. 3 (16 consecutive)): 219-27.
25. Hashemzehi R, Doosti A, Kargar M, Jaafarinia M. Gene cloning and evaluation of the *Acinetobacter baumannii* nlpD gene expression in human dermal fibroblast cells using RT-PCR. Feyz Faslnamah-i Ilmi-Pazhu. 2017;21(4):359-66.