

Identification of *armA*, *tet(39)* genes, and the insertion sequence ISAb4 in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*

Parvaneh Khiabanirad¹, Mohammad Abavisani², Gita Eslami^{3*}, Fatemeh Fallah³, Ali Hashemi⁴

1. Department of Microbiology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2. MSc Student of Medical Microbiology, Department of Microbiology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3. Professor of Microbiology, Department of Microbiology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4. Assistant Professor of Medical Bacteriology, Department of Microbiology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received: 2021/02/10

Accepted: 2021/09/04)

Abstract

Background: During the past two decades, *Acinetobacter baumannii* has been introduced as an important clinical pathogen due to its remarkable ability to cause infections and to acquire resistance to the currently used antibiotics, including β -lactams, aminoglycosides, and tetracyclines. The aim of the present study was to determine the pattern of antimicrobial susceptibility and the prevalence of *armA*, *tet(39)* genes, and the insertion sequence ISAb4 in *A.baumannii* strains collected from burn patients referred to Shahid Motahari hospital in Tehran.

Materials and Methods: Totally, 92 clinical isolates of *A.baumannii* were collected from the burn wounds of inpatients in Motahari hospital in Tehran. The isolates of *Acinetobacter* were identified using laboratory and microbiological tests. Then, for the identification of species, the molecular method was carried out by detecting the presence of the *bla*_{OXA-51} gene. The pattern of antibiotics susceptibility was performed via disk diffusion and the minimum inhibitory concentration (MIC) was performed via microdilution broth, according to CLSI guidelines. The prevalence of *armA*, *tet(39)* genes and the insertion sequence ISAb4 were investigated using PCR and Sequencing.

Results: Out of 92 *A.baumannii*, 95.6%, 89.2%, 97.9%, and 81.5% of the isolates were resistant to gentamicin, amikacin, imipenem, and tetracycline, respectively. All the isolates were also resistant to meropenem. The *armA* gene was detected in 58% of the isolates, while all strains carried *tet(39)* and the insertion sequence ISAb4 was detected in only 3.2% of the isolates.

Conclusion: Our study showed a relatively high distribution of *armA*, *tet(39)* genes, and the insertion sequence ISAb4 in clinical isolates of *A.baumannii*. This can lead to increased concerns and irreparable health costs. Drug administration, recognition of the pattern of antibiotic resistance in *A.baumannii*, and the study of the molecular epidemiology can be effective in counteracting antibiotic resistance.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*; Antimicrobial susceptibility; Resistance genes

* Corresponding author: Dr. Gita Eslami

Email: g_eslami@yahoo.com)

شناسایی ژن‌های *armA*، *tet(39)* و توالی الحاقی ISAb4 در ایزوله‌های بالینی اسینتوباکتر بامانی

پروانه خیابانی‌راد^۱، محمد ابویسانی^۲، دکتر گیتا اسلامی^{۳*}، دکتر فاطمه فلاح^۳، دکتر علی هاشمی^۴

۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
 ۲- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
 ۳- استادیار میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
 ۴- استادیار باکتری‌شناسی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۰۰/۰۶/۱۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۲۲

چکیده:

سابقه و هدف: در دو دهه گذشته اسینتوباکتر بامانی به دلیل توانایی قابل توجه در بروز عفونت‌ها و کسب مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج مثل بتالاکتام‌ها، آمینوگلیکوزیدها و تتراسایکلین‌ها، به عنوان یک پاتوژن بالینی مهم مطرح شده است. هدف این مطالعه، مشخص کردن الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی و شیوع فراوانی ژن‌های مقاومت *armA*، *tet(39)* و توالی الحاقی ISAb4 در ایزوله‌های اسینتوباکتر بامانی جدا شده از بیماران سوختگی در بیمارستان شهید مطهری تهران است.

مواد و روش‌ها: ۹۲ اسینتوباکتر بامانی از زخم سوختگی بیماران بستری در بیمارستان شهید مطهری تهران جدا شد. ابتدا با استفاده از تست‌های آزمایشگاهی و میکروبیولوژی، ایزوله‌های اسینتوباکتر تشخیص داده و سپس برای شناسایی گونه باکتری از روش مولکولی شناسایی حضور ژن *bla*_{OXA-51} استفاده شد. الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیک به روش دیسک دیفیوژن و حداقل غلظت مهارشده (MIC) به روش میکروآیلوشن برآش طبق رهنمودهای CLSI تعیین شد. توزیع ژن‌های مقاومت *armA*، *tet(39)* و توالی الحاقی ISAb4 در ایزوله‌ها با استفاده از PCR و Sequencing مشخص شد.

یافته‌ها: از میان ۹۲ ایزوله اسینتوباکتر بامانی، درصد ۹۵/۶، درصد ۸۹/۲، درصد ۹۷/۹ و درصد ۸۱/۵ ایزوله‌ها به ترتیب مقاوم به جنتامایسین، آمیکاسین، ایمی‌پنم و تتراسایکلین بودند. تمامی ایزوله‌ها نسبت به مروپنم مقاومت نشان دادند. ژن *armA* در ۵۸ (۶۳ درصد) ایزوله‌ها یافت شد؛ در حالی که *tet(39)* در تمامی ایزوله‌ها و توالی الحاقی ISAb4 فقط در ۳۲/۲ درصد از آن‌ها یافت شد.

نتیجه‌گیری: این مطالعه توزیع به نسبت بالایی از ژن‌های *armA*، *tet(39)* و توالی الحاقی ISAb4 را در ایزوله‌های بالینی اسینتوباکتر بامانی نشان می‌دهد؛ نکته‌ای که می‌تواند منجر به ایجاد نگرانی و هزینه‌های بهداشتی غیرقابل جبران شود. مدیریت تجویز دارو، شناخت الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در اسینتوباکتر بامانی و بررسی اپیدمیولوژی مولکولی می‌تواند در مقابله با مقاومت آنتی‌بیوتیکی موثر باشد.

واژگان کلیدی: اسینتوباکتر بامانی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، ژن‌های مقاومت

مقدمه

اسینتوباکتر بامانی، یک کوکوباسیل گرم منفی است که به دلیل نقشی که در عفونت‌های مرتبط با بخش مراقبت از سلامت به خصوص در بیماران بخش مراقبت ویژه (ICU) دارد، یکی از خطرناک‌ترین پاتوژن‌هاست. این باکتری دارای چندین مکانیسم مقاومت است که همین موضوع منجر به پیدایش سویه‌های مقاوم به تمامی آنتی‌بیوتیک‌های تجاری قابل دسترس می‌شود (۱، ۲).

عفونت بیمارستانی به عفونتی گفته می‌شود که بیمار در زمان بستری به آن دچار نبوده و ۴۸ تا ۷۲ ساعت بعد از پذیرش بیمار در بیمارستان، سه روز بعد از ترخیص و یا ۳۰ روز بعد از عمل جراحی ایجاد می‌شود (۱). یکی از میکروارگانیسم‌های مهم که سبب عفونت بیمارستانی می‌شود، باکتری اسینتوباکتر بامانی است.

نویسنده مسئول: دکتر گیتا اسلامی

پست الکترونیک: g_eslami@yahoo.com

۲) جداسازی و تشخیص ایزوله‌ها:

پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه تخصصی گروه میکروبی‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تمامی نمونه‌ها شماره‌گذاری شدند. برای تایید نمونه‌ها، آن‌ها روی محیط کشت بلاد آگار (Merck، آلمان) و مک‌کانکی آگار (Merck، آلمان) کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بعد از انکوباسیون، از کلنی‌های مشکوک به استنوباکتر بامانی لام مستقیم تهیه کرده و در صورت دیدن کوکوباسیل‌های گرم منفی، از تست‌های تشخیصی مرسوم مانند تست اکسیداز، واکنش در محیط TSI (Merck، آلمان)، تولید اسید در محیط OF از کربوهیدرات‌هایی مانند گلوکز و زایلوز، رشد در دمای ۴۴ درجه سانتی‌گراد، رشد روی محیط مک‌کانکی آگار، محیط نیترا و تست حرکت برای تشخیص نهایی استنوباکتر بامانی استفاده شد. پس از تشخیص قطعی استنوباکتر بامانی، سوبه‌ها در محیط تریپتیک سوی برات (Merck، آلمان) غنی شده با ۲۰ درصد گلیسرول تلقیح شده و در ۷۰ درجه سانتی‌گراد تا انجام مراحل بعدی نگهداری شدند (۱۵).

۳) بررسی الگوی مقاومت دارویی به روش دیسک دیفیوژن:

مقاومت دارویی سوبه‌های جدا شده نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ذیل به روش انتشار دیسک در آگار (Disk Diffusion) بر اساس رهنمودهای CLSI ۲۰۱۷ انجام شد (۱۶). از دیسک‌های (Merck، آلمان) ایمپنم (۱۰ μg/ml IMP)، مروپنم (MEM) (۱۰ μg/ml)، جنتامیسین (GM) (۱۰ μg/ml)، آمیکاسین (AK) (۳۰ μg/ml) و تتراسیکلین (TET) (۳۰ μg/ml) استفاده شد. برای کنترل کیفی دیسک‌ها از سوش استاندارد سودوموناس آئروژینوزا ATCC27۸۵۳ استفاده شد.

۴) تعیین الگوی مقاومت دارویی توسط حداقل غلظت مهارتی

رشد (MIC) به روش میکروداپلوشن برات:

ابتدا از کشت ۲۴ ساعته باکتری چند کلنی خالص در محیط تریپتیک سوی برات حل و پس از شش ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کدورت آن بررسی و با استاندارد نیم‌مک‌فارلند مقایسه شد. در ادامه داخل چاهک‌های پلیت الایزا مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت مولر هیتون برات ریخته شد. پودرهای آنتی‌بیوتیکی ایمپنم و مروپنم استفاده شده در این مطالعه از شرکت سیگما و با درجه خلوص ۹۵۰ و ۹۴۰ میکروگرم بر میلی‌گرم تهیه شد. غلظت محلول ذخیره آنتی‌بیوتیکی برای آنتی‌بیوتیک‌ها طبق رهنمودهای CLSI، μg/ml ۵۱۲۰ انتخاب و رقت‌های مختلفی از ۱ تا ۲۵۶ تهیه شد. در مرحله بعد از هر باکتری که پیشتر کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته بود، نیم‌مک‌فارلند تهیه شد و سپس از هر سوسپانسیون نیم‌مک‌فارلند هر باکتری، رقت ۱:۲۰ تهیه کرده و مقدار ۱۰ میکرولیتر داخل هر چاهک ریخته شد. یک لاین به عنوان کنترل منفی که در واقع محلول آنتی‌بیوتیک به همراه محیط مولر هیتون برات است و یک لاین دیگر به عنوان کنترل که در واقع *E. Coli* ATCC25922 است، قرار داده شد (۱۶).

۵) آماده‌سازی نمونه برای بررسی مولکولی:

استخراج DNA باکتری:

برای استخراج DNA، از کیت استخراج DNA تهیه شده از شرکت GENETBIO با مشخصات Lot No. 20140619، Cat.No. K3000 استفاده شد.

شناسایی ژن‌های کدکننده *armA*، *tet39*، *bla*_{OXA51} و ISAb4 به روش PCR:

برای انجام مراحل کار در هر میکروتیوب ۱۲/۵ μl از Master Mix شرکت آمپلیکون، ۱ μl از پرایمرهای Forward و Reverse، ۷/۵ μl آب دیونیزه و ۳ μl از DNA نمونه مورد نظر وارد کرده و با استفاده از سمپلر به خوبی سمپلینگ

۳). استنوباکتر بامانی در بخش‌های سوختگی بیمارستان می‌تواند کلونیزه شود و قادر به ایجاد پنومونی، عفونت دستگاه ادراری و عفونت‌های پوستی در کارکنان بیمارستانی و بیماران بستری در ICUها و استفاده‌کنندگان از تجهیزات مراقبت طولانی‌مدت (به ویژه در بیماران وابسته به ونتیلاتور) است (۴، ۵).

روند رو به افزایش شیوع و بروز مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی مورد توجه مسئولان بهداشتی قرار گرفته است؛ تا آنجا که سازمان بهداشت جهانی سال ۲۰۱۱ را سال مقاومت آنتی‌بیوتیکی نامیده است (۶). مقاومت به کاربامپنم در استنوباکتر بامانی یک مشکل در حال گسترش است. سازمان بهداشت جهانی، استنوباکتر بامانی مقاوم به کاربامپنم را در لیست باکتری‌های حیاتی خطرناک برای سلامت عمومی قرار داده است و پژوهش و توسعه راهکارهای جدید برای مهار آن را به عنوان یک اولویت مطرح کرده است (۷). کاربامپنمازهای تیپ OXA می‌توانند نقش موثری علیه ایمپنم و مروپنم داشته و توالی ISAb4 می‌تواند در این سوبه‌ها مقاومت سطح بالایی القا کند. این کاربامپنمازها به هشت زیرگروه تقسیم می‌شوند که شش زیرگروه آن در استنوباکتر بامانی شناسایی شده است (۸). استنوباکتر بامانی به‌طور طبیعی ژن‌های *bla*_{OXA51} like را حمل می‌کند و بیان بالادست ISAb4 سبب مقاومت باکتری به کاربامپنمازها می‌شود. ISAb4، ISAb3، ISAb2، ISAb4 بیان ژن‌های *bla*_{OXA} را افزایش می‌دهند و منجر به افزایش بروز مقاومت به کاربامپنمازها به واسطه این کاربامپنمازها می‌شود (۹).

پمپ‌های افلاکس نیز از دیگر مکانیسم‌های بروز مقاومت است. پمپ‌های افلاکس چندارویی مانند پمپ‌های Tet(A) و Tet(B)، کلاس‌هایی از مواد ضد میکروبی مشخص را فعالانه به خارج از سلول باکتری می‌فرستند. Tet(A) مقاومت به تتراسیکلین را ایجاد می‌کند و Tet(B)، سبب ایجاد مقاومت نسبت به تتراسایکلین و مینوسایکلین می‌شود (۱۰). ژن *tet39* نیز که روی پلاسمید ۱۸/۲ کیلوبازی pS30 قرار دارد، به عنوان یک عامل مهم در بروز مقاومت به تتراسایکلین در ایزوله‌های محیطی و بالینی مطرح شده است (۱۱). در میان مکانیسم‌های مقاومت، تولید ۱۶SrRNA متیل ترانسفراز (16SRMTases) ها، شامل G1405، *armA* و RmtB بیشترین نگرانی را ایجاد کرده است. 16SRMTases که بیش‌ترین توزیع را در جنس‌های متعدد خانواده اتروباکتریاسه و در سودوموناس آئروژینوزا و استنوباکتر بامانی دارد، اغلب با تولید یک کاربامپنماز یا بتالاکتاماز وسیع‌الطیف (ESBL) همراه است و این موضوع سبب افزایش مقاومت به چنددارو در این باکتری‌ها می‌شود. *armA* که به عنوان متداول‌ترین 16SRMTase در استنوباکتر است، از زیر واحد 30S ریبوزومی در برابر اتصال آمینوگلیکوزید محافظت می‌کند و منجر به افزایش مقدار حداقل غلظت مهارتی رشد (MIC) آمینوگلیکوزید می‌شود (۱۲، ۱۳).

از آنجا که روند رو به افزایش ظهور ایزوله‌های با مقاومت اکتسابی و فنوتیپ‌های با مقاومت به تمامی آنتی‌بیوتیک‌های رایج در استنوباکتر بامانی سبب شده این باکتری به عنوان یک تهدید جهانی برای نظام سلامت مطرح شود (۱۴)، در این بررسی از بیماران بستری در مرکز درمانی تهران، ایزوله‌های استنوباکتر بامانی مقاوم به دارو را جدا کرده و پس از تعیین الگوی فنوتیپی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها، برای شناسایی ژن‌های *armA*، *tet39* و ISAb4 که در بروز مقاومت موثرند، از روش‌های PCR و Sequencing استفاده کرده‌ایم.

مواد و روش‌ها

۱) روش نمونه‌گیری:

در این مطالعه توصیفی، ۹۲ ایزوله استنوباکتر بامانی از بخش سوختگی بیمارستان مطهری تهران جمع‌آوری شد. برای نمونه‌گیری، لایه سطحی زخم سوختگی تمیز و با نرمال سالین شسته شد و نمونه‌ها به وسیله سواب جمع‌آوری شد. در ادامه نمونه‌ها با استفاده از محیط استوارت به آزمایشگاه منتقل شدند. برای تمامی بیماران فرم پرسشنامه تهیه شد. در این پرسشنامه اطلاعاتی نظیر نام بیمار، سن و سایر اطلاعات جانبی مربوط به بیمار مانند سابقه مصرف اخیر آنتی‌بیوتیک‌ها اخذ شد تا در آنالیز نتایج استفاده شوند.

یافته‌ها

۱) نتایج حاصل از نمونه‌گیری:

از ۹۲ ایزوله *اسیتوباکتر بامانی*، ۲۳ ایزوله از خانم‌ها (۲۵ درصد) و ۶۹ ایزوله از آقایان (درصد ۷۵) جدا شد. از نظر توزیع سنی کمترین سن مربوط به بیمار یک ساله و بیشترین مربوط به بیمار ۶۵ ساله بود. در آنالیز آماری، ارتباط معناداری بین فراوانی ایزوله‌های *اسیتوباکتر بامانی* و توزیع جنسیت یافت نشد (P value < ۰,۰۵). سابقه مصرف اخیر آنتی‌بیوتیک از سوی چهار بیمار گزارش شد که در هر چهار بیمار، مصرف آنتی‌بیوتیک به دلیل عفونت‌های پیشین دستگاه ادراری بود.

۲) نتایج حاصل از آنتی‌بیوگرام با استفاده از روش دیسک دیفیوژن:

میزان حساسیت دارویی ایزوله‌های *اسیتوباکتر بامانی* با استفاده از روش دیسک دیفیوژن، مقاومت بالای ایزوله‌ها را نشان داد. جدول ۳، فراوانی ایزوله‌های جدا شده را بر اساس الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی نشان می‌دهد. آنالیزهای آماری، توزیع مقاومت آنتی‌بیوتیک‌ها را در گروه‌های سنی معنادار نشان نداد. همان‌طور که در این جدول نشان داده شده است، در ایزوله‌های بالینی شاهد مقاومت بالای ۹۵ درصد به سه آنتی‌بیوتیک ایمپنم، مروپنم و جنتامایسین بودیم. همه ایزوله‌ها به مروپنم مقاوم بوده و بیشترین حساسیت نسبت به دیسک تراساسایکلین ارزیابی شد.

۳) نتایج تعیین MIC:

مقدار MIC در مورد دو آنتی‌بیوتیک مروپنم و ایمپنم بر اساس استاندارد تفسیری CLSI بررسی و مقادیر آن در جدول ۴ نشان داده شده است.

۴) نتایج بررسی ژن‌های مقاومت به روش مولکولی با استفاده از PCR:

بررسی ژن *bla_{OXA51}like* در ایزوله‌ها، وجود این ژن را در تمامی نمونه‌های بررسی شده نشان داد و همه نمونه‌ها از نظر این ژن مثبت ارزیابی شدند. بررسی شیوع سایر ژن‌های مطالعه شده با استفاده از PCR نشان داد که بیشترین فراوانی (۱۰۰ درصد) مربوط به ژن *tet39* و کمترین (۳/۲ درصد) مربوط به *ISAb4* است. نتایج بررسی فراوانی ژن‌ها در جدول ۵ و تصویر ۱ نمایش داده شده است. تصویر ۲، فراوانی ژن‌های مطالعه شده را در گروه‌های سنی بیماران به صورت نمودار نشان می‌دهد. بیشترین فراوانی ژن *armA* در گروه سنی ۲۱۲۵ سال و کمترین فراوانی آن در گروه سنی ۵۶۶۵ سال بود. بررسی‌های آماری هیچ ارتباط معناداری را بین توزیع ژن‌ها در گروه‌های سنی نشان نداد.

۵) نتایج تعیین توالی محصولات PCR ژن‌های *armA*، *tet39* و *ISAb4*:

پس از تعیین توالی محصولات PCR ژن‌های *armA*، *tet39* و *ISAb4*، توالی‌های حاصله توسط نرم‌افزار Chromas بررسی و با توالی‌های مرجع موجود در Genbank مقایسه و سکانس آن در Genbank با Accession Number (جدول ۶) مربوطه ثبت شد.

جدول ۲. برنامه دمایی مورد نیاز برای تکثیر ژن‌های *ISAb4* و *bla_{OXA51}*، *armA*، *tet39*

فاکتور	زمان (دقیقه)				حرارت (°C)			
	<i>bla_{OXA51}</i>	<i>ISAb4</i>	<i>tet39</i>	<i>armA</i>	<i>bla_{OXA51}</i>	<i>ISAb4</i>	<i>tet39</i>	<i>armA</i>
دنا تورا سیون اولیه	5	5	5	5	94	94	94	94
دنا تورا سیون اتصال	45s	1	1	45s	94	94	94	94
گسترش	45s	1	1	45s	54	46	48	53
گسترش نهایی	5	5	5	5	72	72	72	72
چرخه	36	36	36	36	72	72	72	72

شد. توالی‌های پرایمر برای ژن‌های *ISAb4* و *bla_{OXA51}*، *armA*، *tet39* جدول زیر درج شده است. برای جلوگیری از واکنش‌های ناخواسته و غیرفعال شدن آنزیم، تمامی مراحل کار روی یخ انجام شد. جدول ۲، برنامه دمایی لازم را برای تکثیر ژن‌های بررسی شده نشان می‌دهد.

پس از پایان الکتروفورز، ژل را با اتیدیوم بروماید (۰/۵ μg/ml) رنگ کرده و پس از قرار دادن در دستگاه Gel Documentation، از نظر وجود باندهای هدف در کنار مارکر مولکولی و کنترل‌های مثبت و منفی بررسی شد.

۶) تعیین توالی DNA:

برای تأیید سوبه‌های حاوی ژن‌های مورد نظر، محصول PCR نمونه‌های مثبت از نظر ژن *ISAb4* و *bla_{OXA51}*، *armA*، *tet39* به میزان ۲۰ ناندا از هر محصول PCR و میزان ۱۵ ناندا از پرایمرهای Reverse و Forward مربوط به هر ژن در داخل میکروتیوب‌های ۱/۵ میکرولیتری ریخته و در شرایط مناسب به شرکت تکاپوزیست برای تعیین توالی DNA در کمپانی Bioneer کشور کره جنوبی ارسال شد.

۷) بررسی آماری:

نتایج به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ و آزمون کای دو تجزیه و تحلیل شد. p value برابر یا کمتر از ۵ درصد از نظر آماری معنادار تفسیر می‌شود.

جدول ۱. مشخصات پرایمرهای استفاده شده برای تکثیر ژن

نام پرایمر	سکانس ژن (3'-5')	اندازه محصول	منبع
F arm A	5'-TGGGAAGTTA-AAGACGACGA-3'	212 bp	(17)
R	5'-CCATTC-CCTTCTCCTTTCCA-3'		
F tet39	5'-CTCCTTCTCTATTGTG-GCTA-3'	711 bp	(18)
R	5'-CACTAATACCTCTGG-ACATCA-3'		
F ISAb4	5'-ATTTGAACCCATC-TATTGGC-3'	612 bp	(19)
R	5'-ACTCT-CATATTTTTTCTTGG-3'		
F bla _{OXA51}	5'-TAATGCTTTGATCGG-CCTTG-3'	353 bp	(20)
R	5'-TGGATTG-CACTTCATCTTGG-3'		

جدول ۴. نتایج حداقل غلظت مهارتی آنتی‌بیوتیک‌های مروپنم و ایمینم در ایزوله‌های اسپیتوباکتر بامانی به روش میکروداپلوشن برات

استاندارد تفسیری MIC (µg/ml)	حساس (%)	نیمه‌حساس (%)	مقاوم (%)	آنتی‌بیوتیک‌ها
16 ≤ 8 4 ≥	1/2	-	9/97	ایمینم
16 ≤ 8 4 ≥	-	-	100	مروپنم

جدول ۶. شماره‌های دسترسی سکانس‌های ژن‌های *armA* و *tet39* در Genbank

Accession Number	Gene
KT626610	<i>armA</i>
KT724719	<i>tet39</i>

۹۹ درصد ایزوله‌ها به مروپنم مقاوم گزارش شدند (۲۴). در سال ۲۰۱۴، وکیلی و همکاران در اصفهان، ۸۳ درصد مقاومت به ایمینم و ۹۰ درصد مقاومت به مروپنم را گزارش کردند (۲۵). مقایسه نرخ مقاومت گزارش شده در این مطالعه‌ها و مطالعه ما نشان از روند رو به افزایش مقاومت به ایمینم در ایزوله‌های بیمارستانی دارد. چنانکه در مطالعه رضایی و همکاران در سال ۲۰۲۰ روی ۸۱ ایزوله تنفسی از اسپیتوباکتر بامانی، تمام ایزوله‌ها مقاوم به ایمینم تشخیص داده شدند (۲۶). دلیل بروز این افزایش مقاومت در سال‌های اخیر می‌تواند ناشی از استفاده بیش از اندازه از این آنتی‌بیوتیک‌ها در کشور ما باشد. با وجود استفاده گسترده از کاربامپنم‌ها در این مقطع زمانی، گزارش‌های مقاومت در اسپیتوباکتر بامانی نسبت به آن‌ها و روند رو به افزایش بروز مقاومت به کاربامپنم‌ها این هشدار را به دنبال دارد که ممکن است این نرخ مقاومت به اندازه‌ای بالا برود که تاثیر این آنتی‌بیوتیک‌ها کاهش یابد و دیگر به عنوان یک گزینه درمانی نجات‌بخش برای عفونت‌های اسپیتوباکتر بامانی محسوب نشود (۷). مقاومت به جنتامایسین و آمیکاسین در بررسی حاضر ۹۵/۶ درصد و ۸۹/۱ درصد به دست آمد. در مطالعه‌های دیگر مقاومت به این آنتی‌بیوتیک طی سال‌ها متغیر بوده است. در مطالعه نوری و همکاران که در سال ۲۰۱۴ روی ایزوله‌های اسپیتوباکتر بامانی جدا شده از نمونه‌های مختلف بیماران انجام شد، میزان مقاومت ایزوله‌ها به جنتامایسین ۴۰/۷ درصد و به آمیکاسین ۸۰/۶ درصد گزارش شد (۲۷). اگرچه در آن مطالعه، جنتامایسین در کنار کلیستین موثرترین آنتی‌بیوتیک علیه ایزوله‌های مطالعه شده تشخیص داده شد، اما ایزوله‌های مطالعه شده در مطالعه ما مقاومت بالایی نسبت به جنتامایسین نشان دادند و این آنتی‌بیوتیک تنها روی ۳/۳ درصد از ایزوله‌های مطالعه حاضر اثر مهارتی داشت. بروز مقاومت بالای آنتی‌بیوتیکی در آمینوگلیکوزیدها، که به عنوان یکی از راهکارهای

جدول ۳. توزیع ایزوله‌های اسپیتوباکتر بامانی بر اساس الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و به تفکیک آنتی‌بیوتیک

الگوی مقاومت	مقاوم تعداد(درصد)	حدواسط تعداد(درصد)	حساس تعداد(درصد)
آنتی‌بیوتیک‌ها			
30 µg آمیکاسین	82(89/2)	5 (5/4)	5 (5/4)
10 µg جنتامایسین	88(95/6)	1(1/1)	3(3/3)
10 µg ایمینم	90(97/9)	2(2/1)	-
10 µg مروپنم	92(100)	-	-
10 µg تتراسایکلین	75(81/5)	7(7/6)	10(10/9)

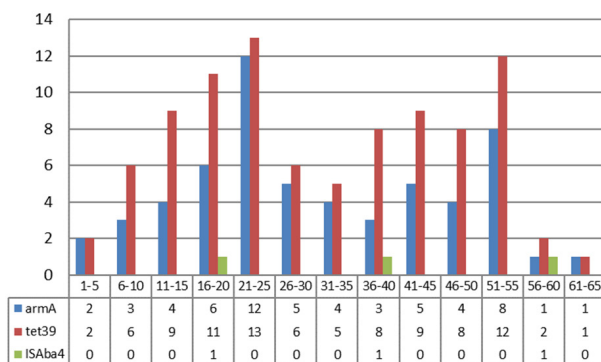
جدول ۵. توزیع فراوانی مطلق و نسبی ژن‌های *armA*، *tet39* و ISAb4 در ایزوله‌های اسپیتوباکتر بامانی

ژن‌ها	ایزوله‌های اسپیتوباکتر بامانی	
	واجد ژن تعداد (درصد)	فاقد ژن تعداد (درصد)
<i>armA</i>	58(63)	34(37)
<i>tet39</i>	92(100)	0(0)
ISAb4	3(3/2)	89(96/8)

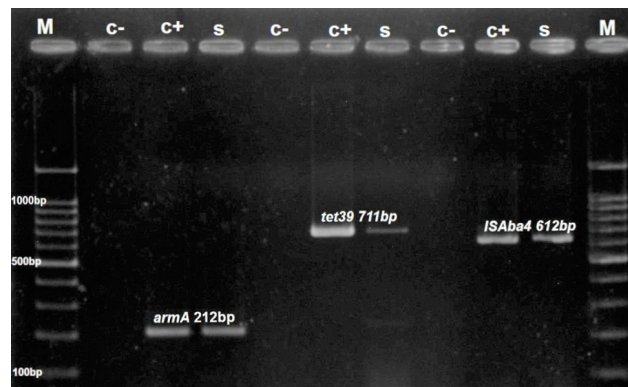
بحث

۱) بررسی فنوتیپی و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی با روش دیسک دیفیوژن:

در ۱۰ سال اخیر، پتانسیل بالای اسپیتوباکتر بامانی در بروز اشکال مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های رایج، سبب شده که این باکتری به عنوان یک پاتوژن خطرناک مطرح شود. مکانیسم‌های مقاومت ضد میکروبی متنوع این باکتری مانند بیان بتالاکتامازها، پمپ‌های ترشحی و پورین‌ها و همچنین توانایی کسب و الحاق عناصر ژنتیکی همچون پلاسمیدها، ترانسپوزون‌ها و اینتگرون‌ها از جمله قابلیت‌های اسپیتوباکتر بامانی است که منجر به نرخ مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالا در این باکتری می‌شود (۲۱). در مطالعه حاضر، میزان مقاومت به ایمینم و مروپنم به ترتیب ۹۷/۹ درصد و ۱۰۰ درصد به دست آمد. پژوهش‌های انجام شده در بسیاری از کشورها از جمله ترکیه، یونان، ایتالیا، اسپانیا، رومانی و انگلیس، حاکی از وجود مقاومت بالای اسپیتوباکتر بامانی به کاربامپنم‌هاست (۲۲، ۲۳). در مطالعه گودرزی و همکاران در سال ۲۰۱۳ در ایران، ۹۱/۵ درصد از ایزوله‌های اسپیتوباکتر بامانی جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان به ایمینم و



تصویر ۲. نمودار فراوانی ژن‌های *armA*، *tet39* و ISAb4 در ایزوله‌های اسپیتوباکتر بامانی به تفکیک گروه‌های سنی مختلف



تصویر ۱. نمایش محصولات حاصل از تکثیر ژن *armA*، *tet39* و ISAb4 روی ژل آگارز ۱٪
اختصارات: M: مارکر ۱۰۰ جفت‌بازی، C- کنترل منفی، C+ کنترل مثبت و S: نمونه مثبت

حساسیت آنتی‌بیوتیکی به تتراسایکلین فراوانی پایینی را داشت. از سوی دیگر، در مطالعه دورقی و همکاران، نشان داده شد که حضور *tet39* در ایزوله‌های *استیتوباکتر بامانی* با فوتیپ مقاومت آن‌ها در برابر تتراسایکلین مرتبط است (۳۷). به طور کلی، ژن پلاسمیدی *tet39* در بروز مقاومت به تتراسایکلین مطرح است. در مطالعه ما نیز، تمامی ایزوله‌ها حامل ژن *tet39* بودند و همچنین مقاومت به تتراسایکلین در ایزوله‌ها، ۸۱/۵ درصد تشخیص داده شد. کاربانه‌های تیپ OXA می‌تواند نقش مؤثری علیه ایمی‌پنم و مروپنم داشته و توالی ISAb4 می‌تواند در القای مقاومت سطح بالا در این سویه‌ها ایفای نقش کند. مطالعه‌ها نشان داده‌اند که ژن *blaOXA23*، در ارتباط با ISAb1 و ISAb4 است (۳۸). در مطالعه حاضر، ۳/۲ درصد از ایزوله‌ها حاوی ISAb4 و برای اطمینان حضور *blaOXA23* در این سه ایزوله نیز مثبت ارزیابی شد. در مطالعه بهادر و همکاران از ایران، در ۶۲ *استیتوباکتر بامانی* جدا شده از بیماران سوختگی، ۱۲/۹ درصد از ایزوله‌ها حامل ژن ISAb4 بودند (۳۹). Cuenca و همکاران در اسپانیا این توالی الحاقی ISAb4 را در هیچ یک از ۲۲۱ ایزوله بالینی *استیتوباکتر بامانی* نیافتند (۴۰). همان‌طور که مشخص است، همانند مطالعه ما در مطالعه‌های انجام شده در جهان فراوانی کمی برای توالی الحاقی ISAb4 در ایزوله‌های

استیتوباکتر بامانی گزارش شده است. با وجود محدودیت در شناسایی جامع مکانیسم‌های موثر بر بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی در *استیتوباکتر بامانی*، مطالعه حاضر ضمن بررسی مکانیسم‌های بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی در *استیتوباکتر بامانی*، بر اهمیت مدیریت دقیق در تجویز دارو با انجام آزمون‌های دقیق آنتی‌بیوگرام قبل از هرگونه تجویز دارویی و لزوم بررسی اپیدمیولوژی مولکولی سویه‌های *استیتوباکتر بامانی* تاکید می‌کند.

پروانه اخلاقی

این پژوهش، حاصل پایان‌نامه خانم پروانه خیابانی‌راد به راهنمایی دکتر گیتا اسلامی برای دریافت مدرک کارشناسی ارشد است. برای حفظ اصول اخلاقی و اصل محرمانه بودن اطلاعات بیماران، این مطالعه اطلاعات شرکت‌کنندگان را ناشناس نگه داشت و هیچ اطلاعات شخصی را جمع‌آوری نکرد.

منابع:

- Inwergbu K, Dave J, Pittard A. Nosocomial infections. Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain. 2005;5(1):14-7.
- Nasr P. Genetics, epidemiology, and clinical manifestations of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. The Journal of hospital infection. 2020;104(1):4-11.
- Fournier PE, Richet H, Weinstein RA. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. Clinical infectious diseases. 2006;42(5):692-9.
- Sievert DM, Ricks P, Edwards JR, Schneider A, Patel J, Srinivasan A, et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009–2010. Infection control and hospital epidemiology. 2013;34(1):1-14.
- Weiner LM, Webb AK, Limbago B, Dudeck MA, Patel J, Kallen AJ, et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011–2014. Infection control & hospital epidemiology. 2016;37(11):1288-301.
- Tseng S-H, Lee C-M, Lin T-Y, Chang S-C, Chang F-Y. Emergence and spread of multi-drug resistant organisms: think globally and act locally. Journal of Microbiology, Immunology and Infection. 2011;44(3):157-65.
- Shrivastava SR, Shrivastava PS, Ramasamy J. World health organization releases global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Journal of Medical Society. 2018;32(1):76.

درمانی علیه عفونت‌های *استیتوباکتر بامانی* معرفی می‌شود، نگران‌کننده است. مرادی و همکاران در بازنگری‌ای که از سال ۲۰۰۱ تا ۲۰۱۴ در ایران انجام دادند، میزان بروز مقاومت به آمیکاسین را در سال‌های نخست ۵۸/۴ درصد و در سال‌های آخر، با افزایش قابل توجهی، مقاومتی را در حدود ۹۵ درصد نشان دادند (۲۸). در مطالعه‌ای که توسط طرفدار و همکاران روی ۵۰ ایزوله بالینی *استیتوباکتر بامانی* جدا شده از بخش سوختگی انجام دادند، ۹۴ درصد ایزوله‌ها به آمیکاسین و ۸۶ درصد ایزوله‌ها به جنتامایسین مقاوم گزارش شدند (۲۹). در مطالعه رشوند و همکاران که در ایران انجام شده است، ۹۸/۴ درصد از ایزوله‌ها هیچ حساسیتی به آمینوگلیکوزیدها بروز ندادند. در این مطالعه نرخ مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به جنتامایسین و آمیکاسین به ترتیب ۹۸/۹۴ درصد و ۸۳/۹ درصد تشخیص داده شد (۳۰). مطالعه‌های انجام شده حاکی از وجود مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالا نسبت به آمینوگلیکوزیدهاست. بروز اشکال مقاوم در برابر آمینوگلیکوزیدها سبب افزایش هزینه‌های مراقبت‌های بهداشتی، افزایش طول بستری بیماران و بروز عوارض شدید و مرگ و میر بیماران می‌شود.

۲) بررسی نتایج مولکولی حاصل از PCR:

یک روش ساده و قابل اعتماد برای شناسایی *استیتوباکتر بامانی*، ردیابی ژن *bla_{OXA51}* است که Turton و همکاران برای شناسایی و تایید گونه معرفی کردند. در مطالعه انجام شده در ایران، آمریکا و ترکیه نیز به ترتیب در ۱۰۰ درصد، ۹۱ درصد و ۱۰۰ درصد ایزوله‌ها این ژن را شناسایی کردند (۲۴، ۳۱، ۳۲). در تحقیق حاضر نیز تمامی ۹۲ ایزوله‌ای که با روش‌های بیوشیمیایی و میکروبی‌شناسی شناسایی شده، دارای ژن *bla_{OXA51}* بوده و به این ترتیب به عنوان *استیتوباکتر بامانی* تایید گونه شدند. در ایزوله‌های مقاوم به آمینوگلیکوزیدها، تتراسایکلین‌ها و کاربانه‌ها، وجود ژن‌های *armA*، *tet39* و ISAb4 تشخیص داده شد. در مطالعه حاضر، ژن *tet39* بیشترین شیوع را با فراوانی ۱۰۰ درصد و ISAb4 کم‌ترین شیوع را با فراوانی ۳/۲ درصد نشان داد. در مطالعه سلیمی‌زند و همکاران در سال ۲۰۱۸، ژن *tet39* در ۴۱/۶ درصد از ایزوله‌های *استیتوباکتر بامانی* ردیابی شد (۳۳). آقازاده و همکاران در سال ۲۰۱۳ در بین ۷۵ ایزوله *استیتوباکتر بامانی* جمع‌آوری شده در سال‌های ۲۰۱۰-۲۰۱۱ از سه مرکز بیمارستانی وابسته به دانشگاه در تهران، شیوع *armA* را ۲۶ درصد گزارش کردند که نسبت حضور این ژن در بیماران سوختگی به بیماران غیرسوختگی برابر با ۸۷/۵ درصد بود (۱۷). از آنجا که مطالعه ما نیز روی بیماران بخش سوختگی انجام شد، شیوع بالای گزارش شده برای ژن *armA* (۶۳ درصد) همسو با این موضوع است. رشوند و همکاران با بررسی ژنتیکی در ایزوله‌های *استیتوباکتر بامانی* غیرحساس به آمینوگلیکوزیدها، حضور ژن *armA* را در ۶۹/۸ درصد از آن‌ها ردیابی کردند که در مقایسه با سایر ژن‌های بررسی شده، به عنوان شایع‌ترین ژن *SRMTase* ۱۶ تشخیص داده شد (۳۰). همچنین در مطالعه Nafplioti و همکاران در سال ۲۰۲۰، ۳/۷ درصد از ایزوله‌های *استیتوباکتر بامانی* مقاوم به آمیکاسین و جنتامایسین، حامل ژن *armA* گزارش شدند (۳۴). در مطالعه ما ۶۳ درصد ایزوله‌ها حامل ژن *armA* تشخیص داده شدند. مطالعه‌های انجام شده حاکی از روند رو به افزایش حضور این ژن مقاومت در ایزوله‌های *استیتوباکتر بامانی* است و پژوهش‌های انجام شده در ایران، نرخ حضور بالایی برای ژن *armA* در ایزوله‌های مطالعه شده در ایران نشان می‌دهد. این موضوع نیز می‌تواند در کاهش تاثیر آمینوگلیکوزیدها در دروند درمانی، به خصوص در درمان بیماران سوختگی نقش داشته باشد. Agerse و همکاران از دانمارک برای نخستین بار به روش PCR ژن پلاسمیدی *tet39* را در سویه‌های محیطی و بالینی *استیتوباکتر مقاوم* به عنوان عامل مقاومت به تتراسایکلین در ۷۵ درصد از نمونه‌های شان یافتند (۳۵). در سال ۲۰۱۳، Tait و همکاران این ژن را در *استیتوباکتر بامانی*‌های جدا شده از بیماران مراکز درمانی آمریکا گزارش کردند (۳۶)، که این ژن پلاسمیدی در مقایسه با الگوی

8. Rezaei A, Fazeli H, Moghadampour M, Halaji M, Faghri J. Determination of antibiotic resistance pattern and prevalence of OXA-type carbapenemases among *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from inpatients in Isfahan, central Iran. *Infez Med*. 2018;26(1):61-6.
9. Lee K, Yong D, Jeong SH, Chong Y. Multidrug-resistant *Acinetobacter* spp.: increasingly problematic nosocomial pathogens. *Yonsei medical journal*. 2011;52(6):879.
10. Coyne S, Courvalin P, Périchon B. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;55(3):947-53.
11. Akers KS, Mende K, Yun HC, Hospenthal DR, Beckius ML, Yu X, et al. Tetracycline susceptibility testing and resistance genes in isolates of *Acinetobacter baumannii*-*Acinetobacter calcoaceticus* complex from a US military hospital. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009;53(6):2693-5.
12. Palmieri M, D'Andrea MM, Pelegrin AC, Perrot N, Mirande C, Blanc B, et al. Abundance of Colistin-Resistant, OXA-23- and ArmA-Producing *Acinetobacter baumannii* Belonging to International Clone 2 in Greece. *Frontiers in microbiology*. 2020;11:668.
13. O'Hara JA, McGann P, Snesrud EC, Clifford RJ, Waterman PE, Lesho EP, et al. Novel 16S rRNA methyltransferase RmtH produced by *Klebsiella pneumoniae* associated with war-related trauma. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013;57(5):2413-6.
14. Harding CM, Hennon SW, Feldman MF. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. *Nature Reviews Microbiology*. 2018;16(2):91.
15. Pormohammad A, Lashkarbolouki S, Azimi T, Gholizadeh P, Boštanghadiri N, Safari H, et al. Clinical characteristics and molecular epidemiology of children with meningitis in Tehran, Iran: a prospective study. *New microbes and new infections*. 2019;32:100594.
16. Testing. CPSfAS. CLSI Supplement M100. 27th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2017.
17. Aghazadeh M, Rezaei MA, Nahaei MR, Mahdian R, Pajand O, Saffari F, et al. Dissemination of aminoglycoside-modifying enzymes and 16S rRNA methylases among *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Microbial Drug Resistance*. 2013;19(4):282-8.
18. Agersø Y, Guardabassi L. Identification of Tet 39, a novel class of tetracycline resistance determinant in *Acinetobacter* spp. of environmental and clinical origin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2005;55(4):566-9.
19. Khorsi K, Messai Y, Hamidi M, Ammari H, Bakour R. High prevalence of multidrug-resistance in *Acinetobacter baumannii* and dissemination of carbapenemase-encoding genes blaOXA-23-like, blaOXA-24-like and blaNDM-1 in Algiers hospitals. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2015;8(6):438-46.
20. Hou C, Yang F. Drug-resistant gene of blaOXA-23, blaOXA-24, bla_{OXA-51} and blaOXA-58 in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(8):13859-63.
21. Harding CM, Hennon SW, Feldman MF. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. *Nature Reviews Microbiology*. 2018;16(2):91-102.
22. Muntean D, Licker M, Horhat F, Dumitrașcu V, Sândesc D, Bedreag O, et al. Extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* and Proteaeae association in a Romanian intensive care unit: risk factors for acquisition. *Infection and drug resistance*. 2018;11:2187.
23. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clinical microbiology reviews*. 2008;21(3):538-82.
24. Goudarzi H, Douraghi M, Ghalavand Z, Goudarzi M. Assessment of antibiotic resistance pattern in *Acinetobacter baumannii* carrying bla oXA type genes isolated from hospitalized patients. *Novelty in Biomedicine*. 2013;1(2):54-61.
25. Vakili B, Fazeli H, Shoaee P, Yaran M, Ataei B, Khorvash F, et al. Detection of colistin sensitivity in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* in Iran. *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*. 2014;19(Suppl 1):S67.
26. Rezaei A, Fazeli H, Faghri J. Investigation of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* ST2 in Iran. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*. 2020.
27. Noori M, Karimi A, Fallah F, Hashemi A, Alimehr S, Goudarzi H, et al. High prevalence of metallo-beta-lactamase producing *Acinetobacter baumannii* isolated from two hospitals of Tehran, Iran. *Archives of Pediatric Infectious Diseases*. 2014;2(3).
28. Moradi J, Hashemi FB, Bahador A. Antibiotic resistance of *Acinetobacter baumannii* in Iran: a systemic review of the published literature. *Osong public health and research perspectives*. 2015;6(2):79-86.
29. Tarafdar F, Jafari B, Azimi T. Evaluating the antimicrobial resistance patterns and molecular frequency of bla (oxa-48) and bla (GES-2) genes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* strains isolated from burn wound infection in Tehran, Iran. *New Microbes New Infect*. 2020;37:100686.
30. Rashvand P, Peymani A, Mohammadi M, Karami AA, Samimi R, Hajian S, et al. Molecular survey of aminoglycoside-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from tertiary hospitals in Qazvin, Iran. *New microbes and new infections*. 2021;42:100883-.
31. Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the bla_{OXA-51}-like carbapenemase gene intrinsic to this species. *Journal of clinical microbiology*. 2006;44(8):2974-6.
32. Özkul C, Hazırolan G. Oxacillinase Gene Distribution, Antibiotic Resistance, and Their Correlation with Biofilm Formation in *Acinetobacter baumannii* Bloodstream Isolates. *Microbial Drug Resistance*. 2020.
33. Salimizand H, Zomorodi AR, Mansury D, Khakshoor M, Azizi O, Khodaparašt S, et al. Diversity of aminoglycoside modifying enzymes and 16S rRNA methylases in *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter nosocomialis* species in Iran; wide distribution of aadA1 and *armA*. *Infection, Genetics and Evolution*. 2018;66:195-9.
34. Nafplioti K, Galani I, Angelidis E, Adamou P, Moraitou E, Giannopoulou P, et al. Dissemination of international clone II *Acinetobacter baumannii* strains coproducing OXA-23 carbapenemase and 16S rRNA methylase ArmA in Athens, Greece. *Microbial Drug Resistance*. 2020;26(1):9-13.
35. Agersø Y, Petersen A. The tetracycline resistance determinant Tet 39 and the sulphonamide resistance gene sulII are common among resistant *Acinetobacter* spp. isolated from integrated fish farms in Thailand. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2007;59(1):23-7.
36. Taitt CR, Leski TA, Stockelman MG, Craft DW, Zurawski DV, Kirkup BC, et al. Antimicrobial resistance determinants in *Acinetobacter baumannii* isolates taken from military treatment facilities. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(2):767-81.
37. Douraghi M, Kenyon JJ, Aris P, Asadian M, Ghourchian S, Hamidian M. Accumulation of Antibiotic Resistance Genes in Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates Belonging to Lineage 2, Global Clone 1, from Outbreaks in 2012-2013 at a Tehran Burns Hospital. *mSphere*. 2020;5(2):e00164-20.
38. Khajuria A, Praharaj AK, Kumar M, Grover N. Molecular characterization of carbapenem resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit of A Tertiary Care Centre at Central India. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*. 2014;8(5):DC38.
39. Bahador A, Raoofian R, Farshadzadeh Z, Beitollahi L, Khaledi A, Rahimi S, et al. The prevalence of ISAbA1 and ISAbA4 in *Acinetobacter baumannii* species of different international clone lineages among patients with burning in Tehran, Iran. *Jundishapur journal of microbiology*. 2015;8(7).
40. Cuenca FF, Sánchez MdCG, Caballero-Moyano FJ, Vila J, Martínez-Martínez L, Bou G, et al. Prevalence and analysis of microbiological factors associated with phenotypic heterogeneous resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *International journal of antimicrobial agents*. 2012;39(6):472-7.