



<https://bjm.ui.ac.ir/?lang=en>

Journal of Microbial Biology

E-ISSN: 3060-7647

13rd Year, Vol. 13, No. 51, Autumn 2024 pp. 81-96

Received: 13/08/2024

Accepted: 01/10/2024

(Research Paper)

Investigation of multidrug resistance (MDR) and distribution of *bla*_{PER}, *bla*_{OXA-51} and *bla*_{OXA-23} genes in *Acinetobacter baumannii* isolated from patients

Hossein Ahmad Kazem

Department of biology, Faculty of science and Research Branch, Islamic Azad University Tehran, Iran

aabn20061@gmail.com

Bitā Behboodīan* 

Department of Agriculture, Kashmar Branch, Islamic Azad University, Kashmar, Iran

bita_behboodian@yahoo.com

Samane Dolatabadi

Department of Microbiology, Neyshabur branch, Islamic Azad University, Neyshabur, Iran

s_dolatabadi1436@yahoo.com

Elahe Vadayekheiry

Research Center for Animal Applied Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

vadaye@yaho.com

Abstract

One of the major problems in treating infections caused by *Acinetobacter baumannii* is the significant increase in antibiotic resistance. Several factors play a role in the resistance of bacteria to drugs and their pathogenicity, one of which is the beta-lactamase protein. Therefore, in this study, the multidrug resistance (MDR) and the distribution of the *bla*_{PER}, *bla*_{OXA-51} and *bla*_{OXA-23} genes in *A. baumannii* were evaluated. Initially, 150 clinical samples were collected from patients admitted to Qochan Hospital in 1400. *A. baumannii* isolates were identified using specific biochemical tests. The phenotype of antibiotic susceptibility of *A. baumannii* isolates to cefepime, ceftriaxone, meropenem and colistin was studied by disc diffusion method. PCR was used to test for the presence of the *bla*_{PER}, *bla*_{OXA-51} and *bla*_{OXA-23} genes in resistant isolates. The results showed that 33.3% of the samples were associated with *A. baumannii* infections, and *A. baumannii* was most commonly isolated from blood samples. In the antibiotic resistance study, 16% of *A. baumannii* isolates were sensitive to cefepime and 17% to ceftriaxone and meropenem antibiotics. No colistin resistant isolates were detected. 75% of the isolates had the MDR phenotype. PCR showed that all resistant isolates tested carried all three genes *bla*_{PER}, *bla*_{OXA-51} and *bla*_{OXA-23}. The results showed that a high percentage of *A. baumannii* isolates tested were resistant to carbapenem antibiotics and a high percentage of carbapenem-resistant isolates produced beta-lactamase genes. The increase in the hospital prevalence of *A. baumannii* highlights the need to develop protective programmes such as the prevention and control of ICU-acquired infections. Molecular methods can also be used to identify these bacteria, determine their antibiotic resistance and prescribe antibiotics accordingly.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, Multidrug resistance, beta-lactamase, Hospital infection

*Corresponding Author

3060-7647/ © 2024 The Authors

This is an open access article under the CC BY-NC-ND/4.0/ License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Ahmadkazem, H., Behboodian, B., Dolatabadi, S., & Vadayekheiry, E. Investigation of multidrug resistance (MDR) and distribution of *bla*_{PER}, *bla*_{OXA-51} and *bla*_{OXA-23} genes in *Acinetobacter baumannii* strain from patients. *Journal of Microbial Biology*, 2024; 13 (51): 81-96. doi: 10.22108/bjm.2024.142453.1609



Introduction

The difficulty of treating and eradicating microorganisms that cause nosocomial infections from the hospital environment is a major challenge for physicians and healthcare workers. Antibiotic resistance is one of the causes of the spread of bacterial strains in hospitals; therefore, the choice of antibiotics for treatment is very important. Gram-negative pathogens have recently become the focus of clinical attention due to their increasing frequency in causing nosocomial infections. *Acinetobacter baumannii* is an opportunistic bacterium that normally grows readily in laboratory environments; other characteristics of this strain are that it is gram-negative, aerobic, non-fermenting, non-motile, polymorphic and usually encapsulated. *A. baumannii* is one of the most important healthcare pathogens that can cause serious infections. Death caused by this bacterium is due to infection with resistant strains, which has caused many problems. Beta-lactamases produced by bacteria are enzymes that destroy the beta-lactam ring in beta-lactam antibiotics, including penicillin and cephalosporins. *A. baumannii* has mechanisms that make it resistant to β -lactam antibiotics, aminoglycosides, tetracyclines and fluoroquinolones. A variety of mechanisms including expression of β -lactam hydrolyzing enzymes, induced changes in outer membrane proteins, up-regulation of multiple drug efflux pumps, changes in penicillin binding proteins (PBPs), antibiotic modifying enzymes, antibiotic target site modification systems, ribosomal protection and purine channel deletion have also been introduced in *A. baumannii*.

Today, several subclasses of class D beta-lactamases have been identified in *A. baumannii*, such as *OXA-23*, *OXA-24/40*, *OXA-58*, *OXA-143*, *OXA-235e*, *OXA-5*, including *OXA-23*, which has spread to many parts of the world by plasmid transfer.

In view of the decline in the effectiveness of antibiotics due to excessive and indiscriminate use, it is necessary to consider measures to ensure the effectiveness of these drugs. The aim of this study is to investigate the resistant strains of *A. baumannii* in Musa Ibn Jafar Qochan Hospital and to replace treatment with other appropriate antibiotics.

Materials & Methods

Collection, isolation and identification of isolates

Initially, 150 clinical samples were collected from 1400 patients admitted to Qochan Hospital. Samples isolated from urinary tract infections, blood, wound infections and surgical wounds were cultured on blood agar base medium and heated at 37°C for 24 hours. *A. baumannii* isolates were then identified using specific biochemical tests.

Antibiotic sensitivity

The phenotype of antibiotic susceptibility of *A. baumannii* isolates to cefepime, ceftriaxone, meropenem and colistin was investigated by the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) disc diffusion method. The results for each antibiotic were recorded as sensitive, intermediate and resistant according to CLSI guidelines.

PCR of *OXA* genes

The PCR technique was used to check for the presence of the *bla_{PER}*, *bla_{OXA-51}* and *bla_{OXA-23}* genes in resistant isolates. The PCR test used primers and the time and temperature programme of the thermocycler to amplify the genes coding for beta-lactamase. PCR products were analyzed using 1.5% agarose gel at 80 V voltage and 50 mA current. SPSS software was used to analyze the results of antibiotic susceptibility testing and PCR of oxa family genes.

Discussion of Results & Conclusions

Identification of isolates

In this study, 33.3% (50 isolates) were related to *A. baumannii* from 150 clinical specimens obtained from hospitalized patients from intensive care, internal, burn and surgical departments of Qochan Hospital. The results of biochemical tests showed that this bacterium was present in various departments of the hospital, intensive care 26%, internal medicine 3%, burns and emergency 13% and surgery 8%. The age range of the patients was 20-25, 25-30, 30-35 and 35-40 years and the frequency of the bacteria was 12, 18, 26 and 44% respectively.

The frequency of *A. baumannii* isolated from different clinical samples was as follows. Blood 40%, Urine 12%, wound 18%, trachea 30%.

Antibiotic resistant

The results of the antibiogram test showed that the frequency of strains resistant to the antibiotics ceftriaxone and meropenem was 83%, while no resistance to colistin was observed. The highest resistance among the isolates was to cefepime with a frequency of 84%.

Cefepime resistance in blood was observed in 38%, which is higher than other clinical samples of resistance to this antibiotic in blood. After blood, resistance to cefepime is second in tracheal samples with 30% resistance. Of the interstitial or semi-sensitive resistances, 33% were related to blood. 43% of blood samples were resistant to ceftriaxone, followed by 29% of tracheal samples. The highest level of semi-sensitive resistance was observed in the chip samples. meropenem is one of the antibiotics for which the percentage of resistance in blood, trachea, urine and wound was 42, 38, 10 and 18% respectively. All isolates from the samples were sensitive to colistin. All strains sensitive to ceftriaxone were related to blood.

In general, the determination of the MDR resistance pattern of isolated strains was performed according to CLSI and CDC guidelines; an MDR bacterium is considered to be a bacterium that is susceptible to at least one agent in three or more antimicrobial categories. According to this study, 75% of *A. baumannii* isolates were resistant to at least one of the three groups of antibiotics used and were identified as having the MDR phenotype.

PCR results

Polymerase chain reaction and specific primers *blaPER*, *blaOXA-51* and *blaOXA-23* were used to detect OXA genes in *A. baumannii* isolates. Out of 50 *A. baumannii* samples, 20 samples resistant to Meropenem were selected.

All isolates expressed *blaPER*, *blaOXA-51* and *blaOXA-23* genes. 100% presence of *blaPER*, *blaOXA-51* and *blaOXA-23* genes in resistant samples indicates the spread of these genes in Iranian and Qochan city strains.

The results showed that a high percentage of *A. baumannii* isolates were resistant to carbapenem antibiotics and a high percentage of carbapenem-resistant isolates produced beta-lactamase genes. Beta-lactamases and carbapenemases also play a key role in multidrug resistance. This is of concern for the control of infections caused by *A. baumannii*. Assessing the presence of genes and their different groups is important to prevent the spread of antibiotic resistance. One of the most important factors in increasing antibiotic resistance is the spread of resistance genes between isolates in different geographical areas.

One of the reasons for the spread of antibiotic resistance is mobile elements, including plasmids, transposons or integrons, which carry clusters of genes resistant to multiple families of antibiotics and play an important role in the spread of MDR strains.

The increasing prevalence of *A. baumannii* in hospitals highlights the need to develop protection programmes, such as the prevention and control of ICU-acquired infections. In addition, molecular methods can be used to identify these bacteria, determine their antibiotic resistance characteristics and prescribe antibiotics accordingly.

بررسی مقاومت چنددارویی (MDR) و توزیع ژن‌های *blaOXA-51*، *blaPER* و *blaOXA-23* در سویه آسینتوباکتر بومانی جدا شده از بیماران

حسین احمد کاظم

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم و فناوری‌های همگرا، واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران

aabn20061@gmail.com

* بیتا بهبودیان

گروه کشاورزی، واحد کاشمر، دانشگاه آزاد اسلامی کاشمر، ایران

bita_behboodian@yahoo.com

سمانه دولت‌آبادی

گروه میکروبیولوژی، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی نیشابور، ایران

s_dolatabadi1436@yahoo.com

الهه ودایع خیری

مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران

vadayee@yahoo.com

چکیده

افزایش چشمگیر مقاومت آنتی‌بیوتیکی یکی از مشکلات اصلی در درمان عفونت‌های ناشی از آسینتوباکتر بومانی است. عوامل مختلفی در مقاوم شدن باکتری در برابر داروها و بیماری‌زایی آن نقش دارند که پروتئین بتالاکتاماز یکی از این عوامل است؛ بنابراین، در این مطالعه مقاومت چند دارویی (MDR: Multidrug resistant) و توزیع ژن‌های *blaOXA-51*، *blaPER* و *blaOXA-23* در آسینتوباکتر بومانی ارزیابی شد. ۱۵۰ نمونه بالینی در سال ۱۴۰۰ از بیماران بیمارستان موسی‌بن‌جعفر قوچان جمع‌آوری شد و جدایه‌های آسینتوباکتر بومانی با آزمایش‌های بیوشیمیایی اختصاصی شناسایی و بررسی فنوتیپ حساسیت آنتی‌بیوتیکی نسبت به سفپیم، سفتریاکسون، مروپنم و کلیستین با روش دیسک دیفیوژن انجام شد. حضور ژن‌های *blaOXA-51*، *blaPER* و *blaOXA-23* در جدایه‌های مقاوم با تکنیک polymerase chain reaction (PCR) سنجش شد. ۳۳/۳ درصد نمونه‌ها مربوط به عفونت‌های آسینتوباکتر بومانی بودند؛ همچنین، این باکتری با بیشترین فراوانی از نمونه‌های خون جدا شد. در بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیک ۱۶ درصد از جدایه‌ها به سفپیم و ۱۷ درصد نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفتریاکسون و مروپنم حساس بودند. هیچ جدایه مقاومی نسبت به کلیستین شناسایی نشد. ۷۵ درصد جدایه‌ها فنوتیپ MDR داشتند و تمامی جدایه‌های مقاوم حامل هر سه ژن *blaOXA-51*، *blaPER* و *blaOXA-23* بودند. نتایج نشان دادند درصد بالایی از جدایه‌های آسینتوباکتر بومانی بررسی شده نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کارباپنم مقاوم بودند و درصد بالایی از جدایه‌های مقاوم به کارباپنم‌ها مولد ژن‌های بتالاکتامازی بودند. افزایش میزان شیوع این باکتری لزوم طراحی برنامه‌های حفاظتی مانند پیشگیری و کنترل عفونت‌ها و طراحی داروهای متناسب را یادآوری می‌کند.

واژگان کلیدی: آسینتوباکتر بومانی، مقاومت چند دارویی، بتالاکتاماز، عفونت بیمارستانی

* نویسنده مسئول مکاتبات

احمد کاظم، حسین، بهبودیان، بیتا، دولت‌آبادی، سمانه، ودایع خیری، الهه. بررسی مقاومت چند دارویی (MDR) و توزیع ژن‌های *blaPER*، *blaOXA-51* و[doi: 10.22108/bjm.2024.142453.1609](https://doi.org/10.22108/bjm.2024.142453.1609) ۹۶-۸۱ (۵۱): ۱۳، ۱۴۰۳، زیست‌شناسی میکروبی.

مقدمه

دشواری درمان و ریشه‌کن کردن میکروارگانیزم‌های عامل عفونت‌های بیمارستانی از محیط بیمارستان یک چالش بزرگ برای پزشکان و کارکنان مراقبت‌های بهداشتی است. مقاومت آنتی‌بیوتیکی یکی از علل گسترش بیمارستانی سویه‌های باکتریایی است؛ از این جهت، انتخاب آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان بسیار حائز اهمیت است (۱). پاتوژن‌های گرم منفی به دلیل فراوانی فزاینده آنها در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی، به‌تازگی کانون توجه بالینی بوده‌اند. آسینتوباکتر بومانی، باکتری فرصت‌طلبی است که به‌طور معمول به‌آسانی در محیط‌های آزمایشگاهی رشد می‌کند؛ از دیگر خصوصیات این سویه این است که گرم منفی، هوازی، غیرتخمیری، غیرمتحرک، پلی‌مورف است و معمولاً کپسول‌دار است (۲).

توانایی آسینتوباکتر بومانی در چسبیدن به سلول‌های اپیتلیال، تولید آنزیم‌ها و سموم و دارابودن اجزای سطحی ضد فاگوسیتیک از مکانیسم‌های بیماری‌زایی آن است. یک مطالعه آزمایشگاهی توسط لی و همکارانش نشان داد این باکتری می‌تواند به سلول‌های اپیتلیال برونش انسان بچسبد و کلنی تشکیل دهد و به‌دنبال چسبندگی قادر به حمله و آپوپتوز سلول‌های یوکاریوتی است. آپوپتوز سلول‌های اپیتلیال ممکن است پوشش مخاطی را مختل کند و اجازه دسترسی باکتری یا محصولات آنها را به بافت‌های عمیق بدهد (۳). در طول دو دهه اخیر، عفونت حاصل از این باکتری از جمله مننژیت، اندوکاردیت، پنومونی کشنده و باکتری می باعث درصد بالایی از مرگ‌ومیر در بیمارستان‌ها شده و به یک مشکل اساسی تبدیل شده است که به‌دلیل ظهور سویه‌های MDR، درمان آنها با مشکلاتی همراه است (۴). آسینتوباکتر بومانی یکی از مهم‌ترین گونه‌ها در عفونت‌های بیمارستانی است که به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم شده است؛

از جمله، می‌توان به بتالاکتام‌ها (پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها) آمینوگلیکوزیدها، کارباپنم‌ها و فلوروکینولون‌ها اشاره کرد (۵).

تولید آنزیم‌های تخریب‌کننده دارو، بیان بیش‌ازحد پمپ‌های دفع دارو و اکتساب پلاسمیدها، ترانسپوزون‌ها یا اینتگرین‌ها، حامل کلاسترهای ژنی مقاومت به چندین خانواده آنتی‌بیوتیکی به‌طور همزمان، نقش مهمی در به دست آوردن مقاومت چنددارویی ایفا می‌کند (۶). بتالاکتام‌های تولیدشده توسط باکتری، آنزیم‌هایی هستند که باعث تخریب حلقه بتالاکتام موجود در آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام شامل پنی‌سیلین و سفالوسپورین‌ها می‌شوند (۷).

امروزه، چند زیرکلاس از بتالاکتام‌های کلاس D در آسینتوباکتر بومانی شناسایی شده‌اند؛ مانند OXA-23، OXA-24/40، OXA-58، OXA-143، OXA-235e که در میان آنها، OXA-23 از طریق مکانیسم انتقال پلاسمید به بسیاری از نقاط در سراسر جهان گسترش یافته است. ظهور خانواده‌های جدیدی از بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف از جمله PER و VEB در سراسر جهان مشکلات مضاعفی ایجاد کرده است (۷).

با توجه به کاهش اثربخشی آنتی‌بیوتیک‌ها به‌علت مصرف زیاد و خودسرانه، لازم است تمهیداتی برای اثربخشی این داروها اندیشیده شود. هدف از این مطالعه، بررسی سویه‌های مقاوم آسینتوباکتر بومانی در بیمارستان موسی‌ابن‌جعفر قوچان و جایگزینی درمان با آنتی‌بیوتیک‌های مناسب دیگر است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری، جداسازی و شناسایی جداپه‌ها

این مطالعه مقطعی بر روی ۱۵۰ بیمار بستری در بخش‌های مراقبت‌های ویژه، بخش داخلی، سوختگی، اورژانس و جراحی بیمارستان موسی‌ابن‌جعفر قوچان انجام شد.

پلی میکسین‌ها)، مروپنم ۱۰ µg (از گروه پلی میکسین‌ها) بودند. دیسک‌های آنتی‌بیوگرام استفاده شده در این پژوهش از شرکت MAST تهیه شدند.

تعیین الگوی مقاومت MDR در سویه‌های جداسازی شده با توجه به CLSI و دستورالعمل CDC (Centers for Disease Control) انجام شد که مطابق آن یک باکتری MDR، به‌عنوان باکتری غیرحساس به دست‌کم یک عامل در سه یا تعداد بیشتری از دسته‌های ضد میکروبی در نظر گرفته می‌شود.

PCR و ردیابی ژن‌های OXA:

برای انجام PCR ابتدا استخراج DNA انجام شد. استخراج با روش جوشاندن (boiling) و با استفاده از کیت استخراج سیناکلون انجام شد. به‌طور خلاصه در این روش، تعداد ۳ تا ۵ کلنی در بافر یا آب مقطر به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شدند و سپس رسوب، سانتریفوژ و به‌عنوان الگو استفاده شد.

برای تکثیر ژن‌های کدکننده بتالاکتامازها از پرایمرهای جدول ۱ و برنامه مطابق جدول ۲ استفاده شد. محصولات PCR با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد و با ولتاژ ۸۰ ولت و جریان ۵۰ میلی‌آمپر بررسی شدند.

از نرم‌افزار spss برای تحلیل نتایج به‌دست‌آمده از آزمون تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی و PCR ژن‌های خانواده *oxa* استفاده شد.

نمونه‌های جدا شده از عفونت‌های ادراری، خون، عفونت زخم‌ها و زخم جراحی، روی محیط پایه بلاد آگار، کشت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شبانه‌روز گرماگذاری شدند. به‌منظور جداسازی اولیه، کشت نمونه‌ها در محیط‌های مک کانکی آگار و بلاد آگار انجام شد. برای شناسایی باکتری آسیتوباکتر بومانی از آزمون‌های مختلف میکروبی شناسی و بیوشیمیایی اختصاصی استفاده شد که در قسمت نتایج به تفصیل ذکر خواهد شد.

تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی

آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیک بر روی باکتری‌هایی که به‌عنوان آسیتوباکتر بومانی شناسایی شدند، با استفاده از روش کربی-بایر دیسک ذیفیوژن Clinical (Laboratory Standards Institute) CLSI انجام شد. از کشت تازه این باکتری‌ها سوسپانسیون نیم مک فارلند، تهیه و سپس روی محیط مولر هیتون آگار، کشت چمنی داده و دیسک‌گذاری انجام شد. بعد از ۲۴ ساعت گرماخانه‌گذاری در حرارت ۳۷ درجه سلسیوس، قطر هاله عدم‌رشد برای هر آنتی‌بیوتیک اندازه‌گیری شد و نتایج برای هر آنتی‌بیوتیک مطابق با دستورالعمل CLSI به‌عنوان حساس، حد واسط و مقاوم ثبت شدند (۸). آنتی‌بیوتیک‌های استفاده شده در این مطالعه شامل سفپیم ۳۰ µg، سفتریاکسون ۳۰ µg (هر دو متعلق به خانواده سفالوسپورین‌ها)، کلستین ۱۰ µg (از گروه

جدول ۱. توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای استفاده شده برای تشخیص حضور ژن‌های مقاومت

Table 1. Nucleotide sequence of primers used to detect the presence of resistance genes

ژن	توالی نوکلئوتیدی	اندازه باند (bp)
<i>bla_{PER}</i>	F5' GCTCCGATAATGAAAAGCGT3' R5' TTCGGCTTGACTCGGCTGA3'	520 bp
<i>bla_{OXA-51}</i>	5'-TAA TGC TTT GAT CGG CTT-3' 5'-TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG-3'	353 bp
<i>bla_{OXA-23}</i>	F: 5'-GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA 3' R; 5'-ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT 3'	500 bp

جدول ۲. برنامه PCR
Table 2. PCR program

Primers	Initial denaturation	Denaturation	Annealing	Extension	Final extension	Cycle number
	<i>bla_{OXA-23}</i>	5min at 94°	30sec at 94°C	30sec at 57°C	45sec at 72°C	7min at 72°C
<i>bla_{PER}</i>	5 min at 94°C	1 min at 94°C	1min at 56°C	1min at 72°C	1min at 72°C	30
<i>bla_{OXA-51}</i>	10min at 94°C	13 min at 94°C	1min at 60°C	1.30min at 72°C	1min at 72°C	30

نتایج و یافته‌ها

نتایج جمع‌آوری، جداسازی و شناسایی جدایه‌ها

محیط کشت بلاد آگار و مک کانکی آگار در کنار آزمون‌های بیوشیمیایی، برای شناسایی و جداکردن جدایه‌های آسینتوباکتر بومانی از نمونه‌های بالینی استفاده شدند. کنترل مثبت سویه ۹۰۳۷ ATCC *E. coli* و *Pseudomonas aeruginosa* کنترل منفی ATCC برای کشت‌ها استفاده شدند.

آسینتوباکتر بومانی روی محیط کشت بلاد آگار کلنی سفید شیری برجسته، موکوئیدی با حاشیه مشخص و فاقد همولیز تولید کرد (شکل ۱. الف). مورفولوژی کلنی‌ها روی مک کانکی آگار، گرد، موکوئیدی با حاشیه مشخص، بدون تخمیر و کوچک‌تر نسبت به محیط بلاد آگار دیده می‌شود (شکل ۱. ب).

رنگ‌آمیزی گرم باکتری‌های خالص‌سازی شده روی مک کانکی یا بلاد آگار، باکتری‌های کوکوباسیل گرم منفی را نشان داد. (شکل ۲)

در بررسی آزمون‌های تشخیص اولیه با آزمون اکسیداز و کاتالاز، باکتری آسینتوباکتر بومانی نسبت به اکسیداز،

منفی و نسبت به کاتالاز مثبت بود. شکل ۳ الف و ب نتیجه این دو آزمون را نشان می‌دهند.

نتایج آزمون (Methyl Red Voges) MRVP Proskauer در جدایه‌ها منفی بودند (شکل ۴. الف) که نشان می‌دهند این باکتری هیچ تخمیری انجام نمی‌دهد. شکل ۴. ب نتایج مربوط به محیط اکسیداتیو و تخمیر (OF) را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، در شرایط بی‌هوازی رشد و تخمیر مشاهده نشدند و فقط رشد در شرایط هوازی انجام شد که حضور مقدار کم اسید باعث تغییر محیط شده است.

شکل ۵ به‌طور خلاصه نتایج آزمون‌های ایندول، TSI، اوره آز و سترات در جدایه‌های کلینیکی را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، آزمون ایندول، تحرک، H₂S، اوره آز منفی، سترات مثبت و تست سه قندی عدم تخمیر هر سه قند گلوکز و لاکتوز و سوکروز را نشان می‌دهد. رنگ محیط به دلیل قلیایی شدن محیط قرمز شده است.



ب

الف

شکل ۱. الف) آسینتوباکتر بومانی بر روی محیط کشت بلاد آگار، ب) آسینتوباکتر بومانی روی محیط کشت مک کانکی آگار
Figure 1. A. *A. baumannii* on blood agar culture medium. Figure 1 B. *A. baumannii* on McConkey agar medium



شکل ۲. رنگ آمیزی گرم آسینتوباکتر بومانی

Figure 2. Gram staining of *A. baumannii*

ب

الف

شکل ۳. الف) نتایج آزمون کاتالاز مثبت ب) نتایج آزمون اکسیداز منفی. سمت راست نمونه استاندارد ۹۰۳۷ *Pseudomonas aeruginosa* و سمت چپ نمونه بالینی آسینتوباکتر بومانی

Figure 3. A: Positive catalase test results. Figure 3. B: Negative oxidase test results. The right side of the standard sample 9037 ATCC *Pseudomonas aeruginosa* and the left side of the clinical sample of *Acinetobacter baumannii*

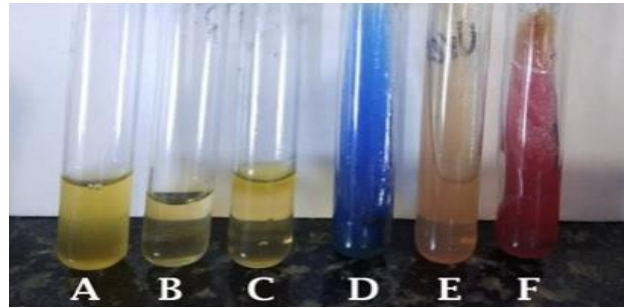


ب

الف

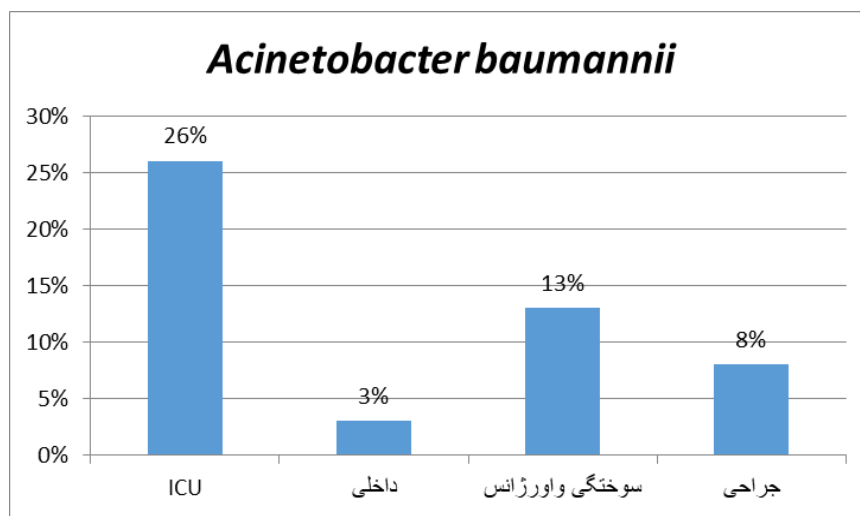
شکل ۴. الف) نتایج MRVP ب) نتایج OF

Figure 4. A: MRVP results. Figure 4: OF results



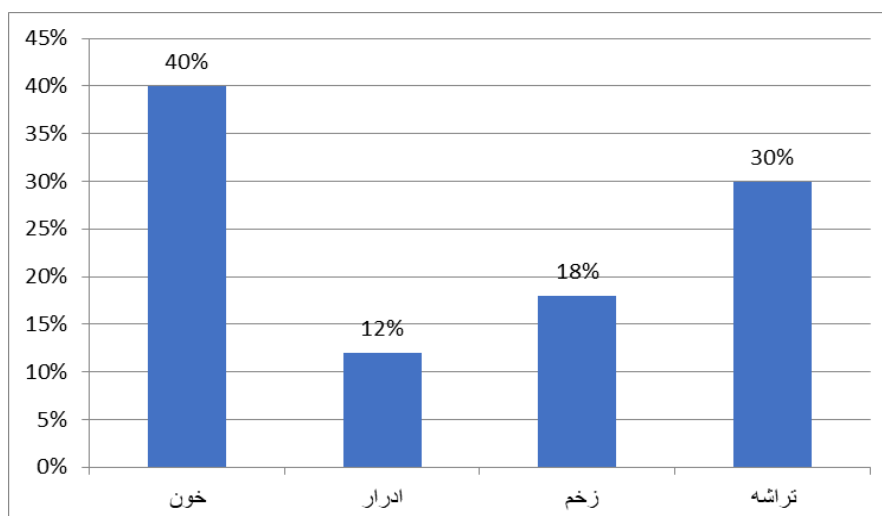
شکل ۵. نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی آسینتوباکتر بومانی. A: MR (-)، VP: B (-)، C: اندول (-)، D: سیترات (+)، E: اوره آز (-)، F: TSI (Alk/Alk, H2S -, Gas -).

Figure 5. The results of biochemical tests of *Acinetobacter baumannii*. A MR (-), VP: B (-), C: Indole (-), D: Citrate (+), E Urease (-), F: TSI (Alk/Alk, H2S -, Gas -)



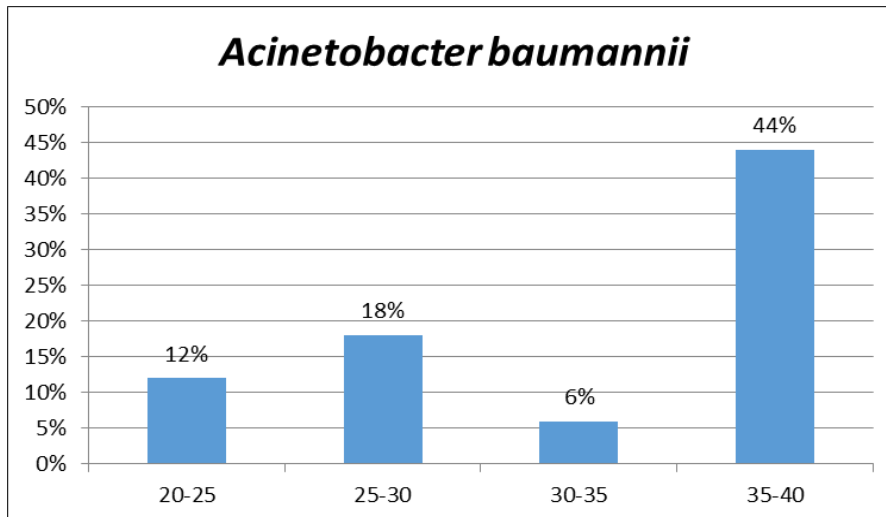
نمودار ۱: فراوانی آسینتوباکتر بومانی جدا شده از بخش‌های مختلف بیمارستان

Diagram 1: Frequency of *A. baumannii* isolated from different departments of the hospital



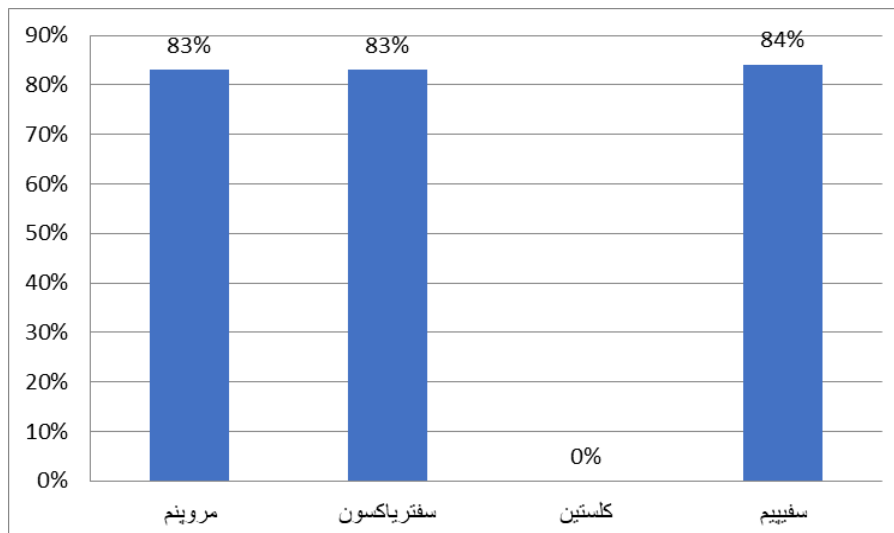
نمودار ۲: فراوانی آسینتوباکتر بومانی جدا شده از نمونه‌های مختلف بالینی.

Diagram 2: Frequency of *A. baumannii* isolated from different clinical samples.



نمودار ۳: فراوانی آسینتوباکتر بومانی جداشده برحسب رده سنی.

Diagram 3: Frequency of isolated *A. baumannii* according to age group.



نمودار ۴: فراوانی سویه‌های مقاوم در جدایه‌های بالینی آسینتوباکتر بومانی

Diagram 4: frequency of resistant strains in clinical isolates of *A. baumannii*

نمونه ادرار شناسایی شدند. نمودار ۲ فراوانی جدایه‌ها را برحسب نمونه بالینی نشان می‌دهد رنج سنی بیماران بین ۲۰-۲۵، ۲۵-۳۰، ۳۰-۳۵ و ۳۵-۴۰ بود که فراوانی باکتری به ترتیب رنج سنی ۱۲، ۱۸، ۲۶ و ۴۴ درصد شناسایی شد (نمودار ۳).

نتایج آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی

نتایج آزمون آنتی‌بیوگرام نشان دادند فراوانی سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های سفتریاکسون و مروپنم ۸۳ درصد بود؛ درحالی‌که هیچ مقاومتی نسبت به کلیستین

۵۰ جدایه آسینتوباکتر بومانی از کل ۱۵۰ نمونه بالینی بیماران بستری در بیمارستان قوچان شناسایی شدند. نتایج به‌دست‌آمده از بررسی آزمون‌های بیوشیمیایی، فراوانی این باکتری را در بخش‌های مختلف بیمارستان، نوع بیماری و رده سنی به شرح زیر مشخص کرده‌اند:

این ۵۰ جدایه مربوط به بخش‌های مراقبت‌های ویژه، بخش داخلی، سوختگی و جراحی بودند (نمودار ۱) که از ۲۰ نمونه خون، ۱۵ نمونه تراشه، ۹ نمونه زخم، ۶

های نمونه‌ها به کلیستین حساس بودند. تمامی سویه‌های حساسی که نسبت به سفتریاکسون مشاهده شدند، مربوط به خون بودند.

تعیین الگوی مقاومت MDR در سویه‌های جداسازی شده با توجه به CLSI و دستورالعمل CDC انجام شد که مطابق با آن، یک باکتری MDR به عنوان باکتری غیرحساس به دست کم یک عامل در سه یا تعداد بیشتری از دسته‌های ضد میکروبی در نظر گرفته می‌شود. براساس این مطالعه ۷۵ درصد جدایه‌های آسینتوباکتر بومانی دست کم به یک عامل از ۳ گروه آنتی‌بیوتیکی استفاده شده مقاوم بودند و به عنوان فنوتیپ MDR شناسایی شدند.

نتایج به دست آمده از آنتی‌بیوگرام براساس مقاوم (R)، نیمه‌حساس (I) و حساس (S) مطابق جدول ۳ گروه‌بندی شدند. همچنین، نمودار ۵ نتایج مقاومت آنتی‌بیوتیکی را به تفکیک نمونه‌های بالینی نشان می‌دهد.

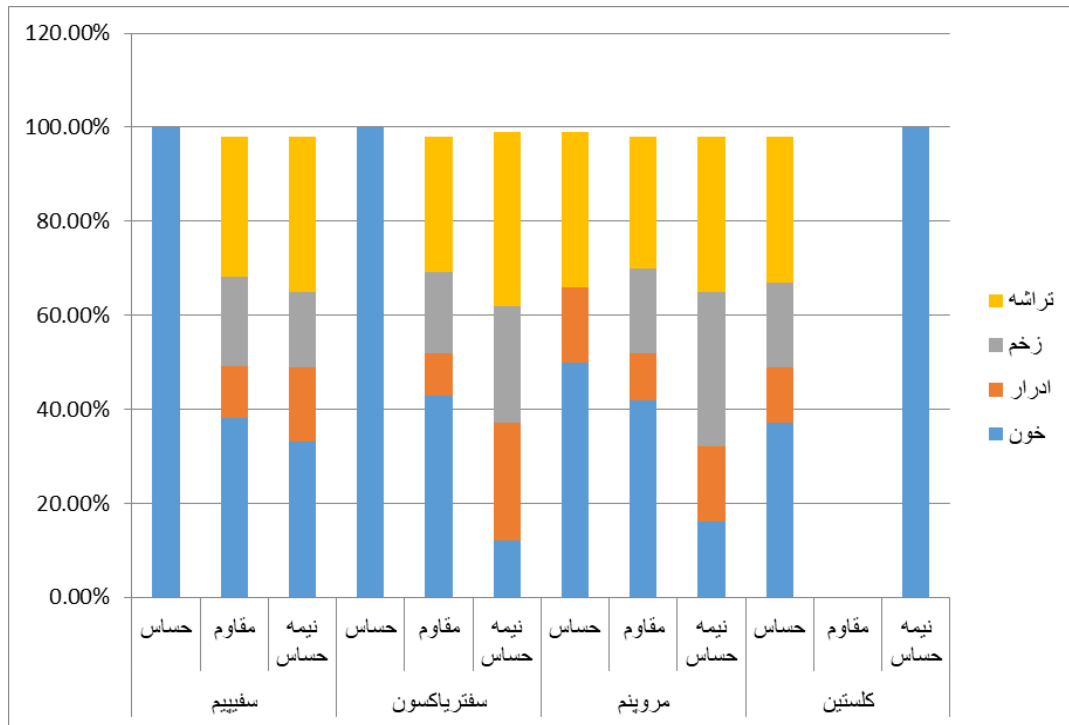
مشاهده نشد. بیشترین مقاومت در جدایه‌ها نسبت به سفپیم با فراوانی ۸۴ درصد مشاهده شد. نمودار ۴ فراوانی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های استفاده شده را در جدایه‌های آسینتوباکتر بومانی نشان می‌دهد.

مقاومت به سفپیم در خون ۳۸ درصد مشاهده شد که نسبت به نمونه‌های بالینی دیگر، مقاومت به این آنتی‌بیوتیک در خون بیشتر بود. بعد از خون، مقاومت نسبت به سفپیم در نمونه‌های تراشه با ۳۰ درصد مقاومت در مکان دوم قرار دارد. در بین مقاومت‌های بینابینی یا نیمه حساس، ۳۳ درصد این مقاومت مربوط به خون بود. ۴۳ درصد نمونه‌های خون نسبت به سفتریاکسون مقاوم بودند که تراشه با ۲۹ درصد در جایگاه دوم قرار داشت. بیشترین مقاومت نیمه‌حساس در نمونه‌های تراشه مشاهده شد. مروینم جزء آنتی‌بیوتیک‌هایی است که درصد مقاومت به آن به ترتیب در خون، تراشه، ادرار و زخم به ترتیب ۴۲، ۳۸، ۱۰ و ۱۸ درصد مشاهده شد. تمام جدایه

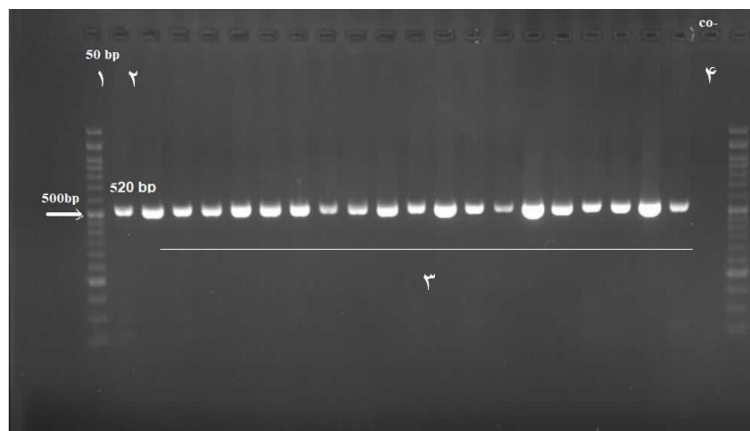
جدول ۳: فراوانی حساسیت، حساسیت بینابینی و مقاومت در جدایه‌های آسینتوباکتر بومانی به تفکیک نمونه‌های بالینی.

Table 3: Frequency of sensitivity, intermediate sensitivity and resistance in *A. baumannii*.

سویه استاندارد	نمونه بالینی	حساسیت		ATCC 19606
		خون	ادرار	
سفپیم	حساس	100.00%	0.00%	0.00%
	مقاوم	38.10%	11.00%	100%
سفتریاکسون	حساس	33.00%	16.00%	0.00%
	مقاوم	100.00%	0.00%	0.00%
مروینم	حساس	43.00%	9.00%	100%
	نیمه حساس	12.00%	25.00%	0.00%
کلیستین	حساس	50.00%	16.00%	0.00%
	مقاوم	42.00%	10.00%	100%
دیسک کنترل	حساس	16.00%	16.00%	0.00%
	نیمه حساس	37.00%	12.00%	100%
دیسک کنترل	حساس	0.00%	0.00%	0.00%
	مقاوم	100.00%	100.00%	100.00%
دیسک کنترل	حساس	0.00%	0.00%	0.00%
	نیمه حساس	0.00%	0.00%	0.00%



نمودار ۵: فراوانی حساسیت، حساسیت بینابینی و مقاومت در جدایه‌های آسیتوباکتر بومانی به تفکیک نمونه‌های بالینی
 Diagram 5. Frequency of sensitivity, intermediate sensitivity and resistance in *A. baumannii*

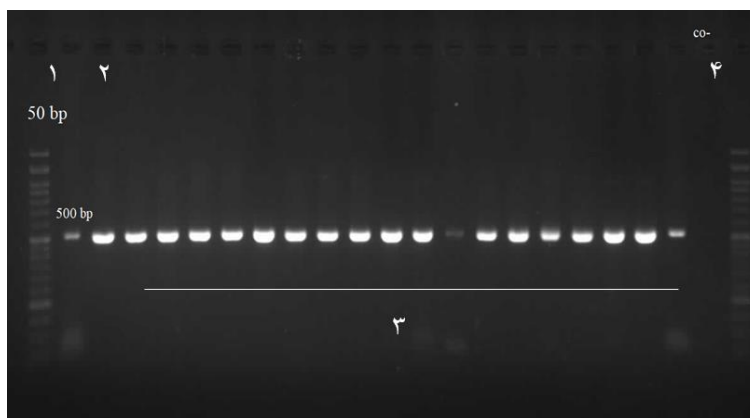


شکل ۶: نتایج مربوط به ژن blaPER در بین جدایه‌ها

Figure 6: Results of *blaPER* gene

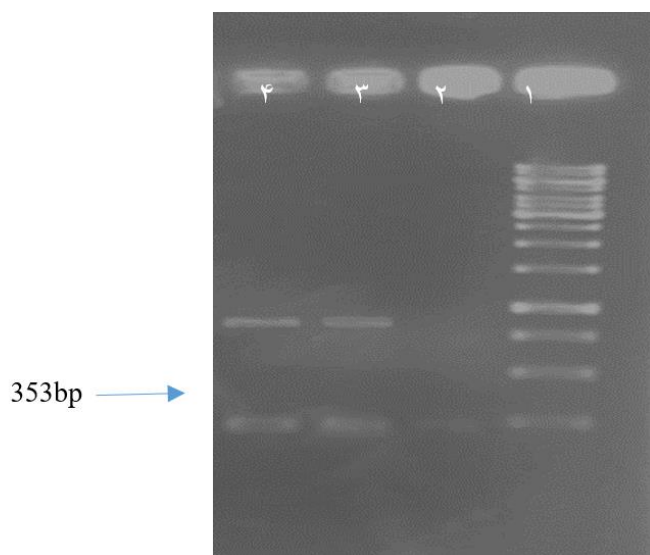
چاهک ۱: لدر؛ چاهک ۲: کنترل مثبت ۳: جدایه‌های شماره ۱ تا ۱۹؛ چاهک ۴: کنترل منفی

Well 1: Ladder; Well 2: positive control; 3: isolates number 1 to 19; Well 4: negative control



شکل ۷: نتایج مربوط به ژن *blaOXA-23* در بین جدایه‌ها. چاهک ۱: لدر؛ چاهک ۲: کنترل مثبت ۳: جدایه‌های شماره ۱ تا ۱۸؛ چاهک ۴: کنترل منفی

Figure7: Results of *blaOXA-23* gene. Well 1: Ladder; Well 2: positive control 3: isolates number 1 to 18; Well 4: negative control



شکل ۸: نتایج مربوط به ژن *blaOXA-51* در بین جدایه‌ها. چاهک ۱: لدر؛ چاهک ۲: کنترل منفی چاهک ۳: جدایه‌های شماره ۱ چاهک ۴: کنترل مثبت

Figure8: Results of *blaOXA-51* gene. Well 1: Ladder; Well 2: negative positive control 3: number 1 isolate; Well 4: positive control

شکل‌های ۶، ۷ و ۸ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، تمامی جدایه‌ها حامل ژن *bla_{PER}*، *blaOXA-23* و *blaOXA-51* بودند.

بحث و نتیجه‌گیری

آسینتوباکتر بومانی از پاتوژن‌های مهم در مراقبت‌های بهداشتی محسوب می‌شود که عفونت‌های خطرناکی را می‌تواند ایجاد کند. مرگ‌ومیر ناشی از این باکتری به

PCR و ردیابی ژن‌های OXA

برای ردیابی ژن‌های OXA در سویه‌های آسینتوباکتر بومانی از جدایه‌های این باکتری از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و پرایمرهای اختصاصی *bla_{PER}*، *blaOXA-51* و *blaOXA-23* استفاده شد. از ۵۰ نمونه آسینتوباکتر بومانی، ۲۰ نمونه مقاوم به مروینم انتخاب شدند.

وجود باند اختصاصی مربوط به هر ژن در

۲۰۰۷ به ۷۴ درصد در سال‌های ۲۰۱۰-۲۰۱۵ با میانگین شیوع ۷۵ درصد افزایش یافته است. نرخ بروز سویه‌های MDR مشاهده شده در مطالعه حاضر، مشابه نرخ‌های گزارش شده قبلی از عراق ۶۷ درصد بود (۱۵) و همچنین، کمتر از نرخ گزارش شده از کشورهای همسایه مانند پاکستان (۱۰۰ درصد) (۱۶)، کویت (۸۵ درصد) (۱۷) و امارات متحده عربی (۸۳ درصد) (۱۸) بود. همچنین، تمام جدایه‌های نمونه‌ها به کلیستین حساس بودند. حساسیت آسینتوباکتر بومانی به کلیستین در مطالعات متعددی گزارش شده است (۱۹، ۲۰). از آنجایی که مقاومت آنتی‌بیوتیکی در آسینتوباکترها بواسطه مکانیسم‌های اکتسابی مانند تغییر آنزیمی، موتاسیون در ژن هدف، تغییر نفوذپذیری غشاء خارجی و افزایش بیان ایفلاکس پمپ‌ها است، فنوتیپ مقاومت به کلیستین که در تعدادی از پژوهش‌ها گزارش شده است، هنوز به خوبی، شناخته نشده و با نام‌های دیگری مانند مقاومت انطباقی در آسینتوباکتر گزارش شده است. این مقاومت ممکن است بیشتر به دلیل رژیم‌های درمانی پایین‌تر از دوز توصیه شده برای بعضی از محصولات کلیستین مانند متان سولفونات باشد (۲۱).

حضور صد درصدی ژن‌های *blaOXA-51* و *blaPER* در نمونه‌های مقاوم نشان‌دهنده گسترش این ژن‌ها در سویه‌های ایرانی و شهر قوچان است. مطالعات جالبی در خصوص شناسایی گونه آسینتوباکتر بومانی و وجود ژن *blaOXA-51* انجام شده‌اند. ژن *blaOXA-51* ژن ذاتی گونه آسینتوباکتر بومانی است و در مجموعه وسیعی از جدایه‌های مربوطه شناسایی شده است. این جدایه‌ها حتی شامل جدایه‌های مجموعه بومانی از مناطق مختلف جغرافیایی جمع‌آوری شده است (۱۲). نکته حائز اهمیت این است که جدایه‌هایی که کاربایتماز آنها روی پلاسمید قرار دارند و فنوتیپ مشابه و دارای ژن شبه *blaOXA-51* هستند، با گونه‌های ژنتیکی دیگر مطابقت ندارند (۱۲). بررسی انجام شده در نیال نشان داد ۵۷/۶-

دلیل عفونت با سویه‌های مقاوم است که در عفونت‌های بیمارستانی مشکلات زیادی برای پزشکان و کارکنان، ایجاد و درمان را با چالش روبه‌رو کرده است (۹). کاربایتم‌ها آخرین خط درمانی آنتی‌بیوتیکی در آسینتوباکتر بومانی در موارد مقاومت به بتالاکتام‌ها هستند. بروز سویه‌های مقاوم به کاربایتم، گزینه‌های درمان آنها را کاهش داده است. عناصر متحرک شامل پلاسمیدها، ترانسپوزون‌ها یا اینتگرون‌ها از دلایل گسترش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی هستند که به‌طور همزمان کلاسترهای ژنی مقاوم به چند خانواده آنتی‌بیوتیکی را حمل می‌کنند و نقش مهمی در گسترش سویه‌های MDR دارند. در مطالعه حاضر از ۱۵۰ نمونه بالینی که از بیماران بستری از بخش‌های مراقبت‌های ویژه، بخش داخلی، سوختگی و جراحی بیمارستان قوچان دریافت شد، ۳۳/۳ (۵۰ جدایه) درصد مربوط به آسینتوباکتر بومانی بودند. این باکتری با بیشترین فراوانی از نمونه‌های خون جدا شد که مطابق با مطالعه بانرجی و مخالف با مطالعات انجام شده در اسپانیا و غرب کانادا بود (۱۰، ۱۱). در بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی مشاهده شد ۱۶ درصد از جدایه‌های آسینتوباکتر بومانی به سفپیم و ۱۷ درصد نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفتریاکسون و مروپنم حساس بودند؛ در حالی که تمامی سویه‌ها حساس یا نیمه‌حساس به کلیستین بودند. در مطالعه انجام شده توسط کوپس و همکاران در سال ۲۰۱۶، میزان مقاومت به کاربایتم‌ها ۸۸ درصد بود که تقریباً مطابق با مطالعه حاضر گزارش شده است (۱۲). در مطالعه نوپان و همکاران، ۸۸ درصد جدایه‌ها مقاوم و ۱ درصد حساس به مروپنم گزارش شده‌اند (۱۳). در مطالعه لین و همکاران در تایوان، مقاومت نسبت به سیروفلوکساسین، مروپنم، آمپیسیلین سولباکتام، آرترونام، جتتامایسین، سفتازیدیم و سفپیم، به میزان ۵۴ تا ۹۵ درصد بود (۱۴). در ایران، فراوانی MDR آسینتوباکتر بومانی از ۵۰ درصد در سال‌های ۲۰۰۱-

ژن‌های مقاومت بین جدایه‌ها در مناطق مختلف جغرافیایی است.

مطابق نتایج به‌دست آمده، هنوز کلیسیتین در درمان موثر است. پیشنهاد می‌شود به‌منظور جلوگیری از ایجاد گونه‌های مقاوم جدید، از منوترابی با کلیسیتین خودداری شود و از این دارو همزمان با دیگر داروهای که نتایج بهتری در درمان نشان می‌دهند، به صورت ترکیبی استفاده شود. همچنین، با توجه به مصرف این دارو به‌عنوان آخرین خط درمان، به نظر می‌رسد انتقال مقاومت از باکتری‌های روده‌ای به آسینتوباکتر سبب نگرانی بیشتری است؛ از این رو، به‌کارگیری رژیم‌های درمانی جدید و حساسیت بیشتر در تشخیص به‌موقع و کنترل عفونت‌های بیمارستانی امری ضروری به نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی: از مسئولان و کارکنان آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد و بیمارستان موسی‌بن جعفر قوچان تشکر و قدردانی می‌شود.

References

- Rosalino, V., Georgina, S., Andr, L., Á MM, Nabil E, Vega L, et al. *Acinetobacter baumannii* Resistance: A Real Challenge for Clinicians. *Antibiotics*, 2020; 9(205): 1–22. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040205>
- Kyriakidis I, Vasileiou E, Pana ZD, Tragiannidis A. *Acinetobacter baumannii* antibiotic resistance mechanisms. *Pathogens*, 2021; 10(3): 1–31. <https://doi.org/10.3390/pathogens10030373>
- Lee CR, Lee JH, Park M, Park KS, Bae IK, Kim YB, et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017; 7(MAR). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00055>
- Ibrahim S, Al-Saryi N, Al-Kadmy IMS, Aziz SN. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* as an emerging concern in hospitals. *Mol Biol Rep*, 2021; 48(10): 6987–98. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06690-6>
- Kengkla K, Kongpakwattana K, Saokaew S, Apisarnthanarak A, Chaiyakunapruk N. Comparative efficacy and safety of treatment options for MDR and XDR *Acinetobacter baumannii* infections: A systematic review and network meta-analysis. *J Antimicrob Chemother*, 2018; 73(1): 22–32. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx368>
- Colquhoun JM, Farokhyfar M, Hutcheson AR, Anderson A, Bethel CR, Bonomo RA, et al. OXA-23 b -Lactamase Overexpression in *Acinetobacter* Genetic Vulnerabilities. *MBio*, 2021; 12(6): e03137-21. <https://doi.org/10.1128/mBio.03137-21>
- Graña-Miraglia L, Evans BA, López-Jácóme LE, Hernández-Durán M, Colín-Castro CA, Volkow-Fernández P, et al. Origin of OXA-23 Variant OXA-239 from a Recently Emerged Lineage of *Acinetobacter baumannii* International Clone V. *mSphere*, 2020; 5(1). <https://doi.org/10.1128/msphere.00801-19>

8. Koleri J, Petkar HM, Hussam HA, Muna MA. Candida auris Blood stream infection- a descriptive study from Qatar. *BMC Infect Dis*, 2023; 23(1): 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12879-023-08477-5>
9. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol*, 2007; 5 (12): 939–51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1789>
10. Banerjee T, Mishra A, Das A, Sharma S, Barman H, Yadav G. High Prevalence and Endemicity of Multidrug Resistant *Acinetobacter* spp. in Intensive Care Unit of a Tertiary Care Hospital, Varanasi, India. *J Pathog*, 2018; 2018: 1–8. <https://doi.org/10.1155/2018/9129083>
11. Peleg AY, Bell JM, Hofmeyr A, Wiese P. Inter-country transfer of Gram-negative organisms carrying the VIM-4 and OXA-58 carbapenem-hydrolysing enzymes [2]. *J Antimicrob Chemother*, 2006; 57(4): 794–5. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl036>
12. Kobs VC, Ferreira JA, Bobrowicz TA, Ferreira LE, Deglmann RC, Westphal GA, et al. The role of the genetic elements bla_{oxa} and ISAba1 in the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex in carbapenem resistance in the hospital setting. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2016; 49(4): 433-40. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0002-2016>
13. Neupane L, Kumar Shah A, Rayamajhee B, Singh A. Molecular Detection of bla_{oxa}-23 Gene from Carbapenem Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolated from a Tertiary Care Hospital of Nepal. 2020; 1–22. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-80691/v1>
14. Lin YC, Sheng WH, Chen YC, Chang SC, Hsia KC, Li SY. Differences in carbapenem resistance genes among *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter genospecies* 3 and *Acinetobacter genospecies* 13TU in Taiwan. *Int J Antimicrob Agents*, 2010; 35(5): 439–43. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.11.020>
15. AL-Kadmy IMS, Ali ANM, Salman IMA, Khazaal SS. Molecular characterization of *Acinetobacter baumannii* isolated from Iraqi hospital environment. *New Microbes New Infect*, 2018; 21: 51–7. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2017.10.010>
16. Begum S, Hasan F, Hussain S, Shah AA. Prevalence of multi drug resistant *Acinetobacter baumannii* in the clinical samples from tertiary care hospital in Islamabad, Pakistan. *Pakistan J Med Sci*, 2013; 29(5): 1253–8. <https://doi.org/10.12669/pjms.295.3695>
17. Al-Sweih NA, Al-Hubail M, Rotimi VO. Three distinct clones of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* with high diversity of carbapenemases isolated from patients in two hospitals in Kuwait. *J Infect Public Health*, 2012; 5(1): 102–8. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2011.11.004>
18. Sonnevend A, Ghazawi A, Al Munthari N, Pitout M, Hamadeh MB, Hashmey R, et al. Characteristics of epidemic and sporadic strains of *Acinetobacter baumannii* isolated in Abu Dhabi hospitals. *J Med Microbiol*, 2013; 62(PART4): 582–90. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.055681-0>
19. Smolyakov R, Borer A, Riesenber K, Schlaeffer F, Alkan M, Porath A, et al. Nosocomial multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* bloodstream infection: Risk factors and outcome with ampicillin-sulbactam treatment. *J Hosp Infect*, 2003 May; 54(1): 32–8. [https://doi.org/10.1016/S0195-6701\(03\)00046-X](https://doi.org/10.1016/S0195-6701(03)00046-X)
20. Ghasemian R, Ahanjan M, Fatehi E, Shokri M. Prevalence and Antibiotic Resistance Pattern of *Acinetobacter* Isolated from Patients Admitted in ICUs in Mazandaran, Northern Iran. *Glob J Health Sci*, 2016; 8(11): 112. <https://doi.org/10.5539/gjhs.v8n11p112>
21. Li J, Rayner CR, Nation RL, Owen RJ, Spelman D, Tan KE, et al. Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006; 50(9): 2946–50. <https://doi.org/10.1128/aac.00103-06>
22. Joshi PR, Acharya M, Kakshapati T, Leungtongkam U, Thummeepak R, Sithisak S. Co-existence of bla_{OXA}-23 and bla_{NDM}-1 genes of *Acinetobacter baumannii* isolated from Nepal: Antimicrobial resistance and clinical significance. *Antimicrob Resist Infect Control*, 2017; 6(1): 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13756-017-0180-5>
23. Shrestha S, Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Ohara H, Shimada K, Satou K, et al. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in a university hospital in Nepal reveals the emergence of a novel epidemic clonal lineage. *Int J Antimicrob Agents*, 2015; 46(5): 526–31. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020>