تشخیص مولکولی ژنهای bla_{SPM},bla_{VIM}, bla_{IMP} در سویه های اسینتوباکتر مقاوم به ایمیپنم جدا شده از نمونه های بالینی

مونا عابدین[۱]، فرشته شاهچراغی[۲] *

۱.دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه زیست شناسی
۲.میکروب شناس، دانشیار انستیتو پاستورایران

* نشانی برای مکاتبه: تهران- خیابان پاستور، انستیتو پاستور ایران، بخش میکروب شناسی، تلفن و نمابر ۶۶۴۰۵۵۳۵،
shahcheraghifereshteh@yahoo.com

دریافت مقاله: بهمن نود پذیرش برای چاپ: فروردین نود و یک

چکیده

سابقه و هدف: *بتالاکتامازهای کلاس B از جمله IMP, VIM, SPM که متالوبتالاکتاماز خوانده می شوند، به عنوان یکی از مکانیسم های ایجاد مقاومت به کرباپنم ها در سویه های اسینتوباکتر محسوب می شوند. این امر مشکلات بسیاری در درمان عفونت های ناشی از این باکتری ایجاد کرده است. این مطالعه با هدف تعیین میزان مقاومت سویه های اسینتوباکتر جدا شده از نمونه های کلینیکی نسبت به ایمیپنم و بررسی ژن های متالوبتالاکتاماز bla_{IMP-I} , bla_{VIM-I}, bla_{SPM-I} در باکتری های ایزوله شده صورت گرفت.*

روش کار: *مجموع ۱۰۰ سویه اسینتوباکتر از بیمارستان شریعتی و بقیه الله تهران، جمع آوری گردید. تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی با روش انتشار درآگار و تعیین حداقل غلظت بازدارنده (MIC) ایمیپنم توسط روش Microbroth dilution انجام شد. آزمون PCR این سویه ها توسط پرایمرهای اختصاصی ژنهای bla_{IMP-I}, bla_{VIM-I}, bla_{SPM-I} انجام شد.*

یافته ها: *در مجموع ۵۰ سویه اسینتوباکتر مقاوم به ایمیپنم با جداسازی گردید. اکثرسویه ها دارای حداقل غلظت بازدارندگی برابر یا بیش از ۶۴µg/ml بودند. فراوانی ژن های bla_{VIM-I},bla_{SPM-I} ۲۶٪ و ۱۴٪ بود. ژن bla_{IMP-I} در این سویه ها یافت نشد.*

نتیجه گیری: *مقاومت سویه های اسینتوباکتر نسبت به کرباپنم ها به عنوان یک مشکل جدی در بیماران مبتلا به این میکروارگانیسم ها محسوب می شود. به دلیل اهمیت سویه های مولد متالوبتالاکتامازها در بیمارستان ها، شناسایی این سویه ها گامی مهم در درمان و کنترل عفونت های بیمارستانی ناشی از این سویه ها به شمار می رود.*

واژگان کلیدی: ***اسینتوباکتر، متالوبتالاکتاماز VIM-I، متالوبتالاکتاماز SPM- I، متالوبتالاکتاماز IMP-I***

مقدمه

کرباپنم ها یکی از مهم ترین آنتی بیوتیک های بتالاکتام موثر بر ارگانیسم های گرم مثبت و گرم منفی به شمار می روند(۱). این آنتی بیوتیک ها نسبت به پنی سیلینازها و سفالوسپورینازها مقاوم هستند. با این وجود دسته ای از بتالاکتامازها که در طرح طبقه بندی Ambler در گروه B قرار می گیرند، به نام متالوبتالاکتامازها، توانایی هیدرولیز کرباپنم ها را دارند. متالوبتا لاکتامازها سبب ایجاد مقاومت به انواع آنتی بیوتیک های بتالاکتام(پنی سیلین ها، سفالوسپورین ها و کرباپنم ها) می شوند(۲). تولید آنزیم بتالاکتاماز نوع IMP نخستین بار در سویه های سودوموناس ائروجینوزا در سال ۱۹۹۱ در ژاپن گزارش شد. پس از آن در اروپا، آسیا و آمریکا مواردی از آن گزارش گردید(۴،۳). اولین سویه سودوموناس حامل ژن bla_{VIM-1} در ایتالیا در سال ۱۹۹۷ جداسازی گردید(۵). در نهایت ژن bla_{SPM-I} در سال ۱۹۹۷ در کشور برزیل و در سودوموناس شناسایی شد(۶). متالوبتالاکتامازها توسط مهارکننده های بتالاکتامازها نظیر: سولباکتام، تازوباکتام و کلاولانیک اسید مهار نمی شوند. در نتیجه در میحطهای آزمایشگاهی توسط ترکیباتی همچون: اتیلن دی آمین تترااستیک اسید، سدیم مرکاپتواستیک اسید و ۲- مرکاپتواستیک اسید مهار می گردند(۷). متالوبتالاکتامازهای نوع IMP, VIM و SPM از مهم ترین متالوبتالاکتامازهای شناسایی شده در سویه های اسینتوباکتر محسوب می شوند(۸).گونه های اسینتوباکتر پاتوژن های فرصت طلب مسئول ایجاد عفونت های بیمارستانی محسوب می شوند. این دسته از ارگانیسم ها، فلور نرمال پوست و دستگاه تنفسی فوقانی هستند. به همین خاطر به خصوص در افرادی که دارای نقص سیستم ایمنی و یا بیماری زمینه ای هستند، منجر به ایجاد عفونت های مجاری ادراری، عفونت های زخم و بافت های نرم، مننژیت و پنومونی میگردند(۹). با ظهور سویه های مقاوم اسینتوباکتر درمان عفونت های ناشی از این باکتری به عنوان یک مشکل مهم بهداشتی در بسیاری از کشورها مورد توجه میباشد. در حال حاضر ازکرباپنم ها در درمان عونت های اسینتوباکتر مقاوم به چندین آنتی بیوتیک (MDR) استفاده میشود، اگرچه مقاومت به این دارو نیز در حال افزایش است(۱۲-۱۰).

هدف از انجام این بررسی تعیین حساسیت ضد میکروبی سویه های اسینتوباکتر جدا شده از نمونه های کلینیکی نسبت به آنتی بیوتیک ایمیپنم و همچنین بررسی ژن های متالوبتالاکتامازهای نوع IMP, VIM و SPM در این ایزوله ها بود.

روش کار

در فاصله ماه های بهمن تا خرداد سال ۱۳۹۰، تعداد ۵۰ نمونه کلینیکی اسینتوباکترمقاوم به ایمیپنم از نمونه های بالینی خون، تراشه ، زخم، مایع مغزی نخاعی، ادرار از ۲ بیمارستان در تهران جمع آوری شد . به منظور تایید این میکروارگانیسم ها از تست های بیوشیمیایی تشخیصی استفاده گردید. سپس تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی توسط روش دیسک دیفیوژن به منظور جداسازی سویه های مقاوم به ایمیپنم انجام گرفت . سویه هایی از اسینتوباکتر با قطر هاله برابر یا بیش از ۱۳ میلی متر، مقاوم به ایمیپنم در نظر گرفته شد. تعیین MIC سویه هایی از اسینتوباکتر که قطر هاله عدم رشد آن کمتر از ۱۳(مقاوم) بود با روش micro-broth dilution و براساس استانداردهای CLSI انجام شد. به منظور کنترل هر دو روش دیسک دیفیوژن و MIC از سویه E.coli ATCC 25922 استفاده شد(۱۴،۱۳).پس از شناسایی سویه های مقاوم به ایمیپنم استخراج DNA توسط کیت شرکت KIAGENE انجام شد. دراین مطالعه پس از تعیین جنس به روش بیو شیمیایی جهت تعیین نوع گونه از bla_{OXA-51} که اختصاص به نوع گونه اسینتوباکتر بومانی دارد استفاده شد(۱۵).

به منظور شناسایی ژنهای متالوبتالاکتاماز bla_{IMP-I}, bla_{VIM-I},bla_{SPM-I} از روش PCR استفاده شد. مواد و حجم مورد نیاز برای واکنش PCR به شرح: ۱ میکرولیتر از نمونه DNA، ۵ میکرولیتراز هر پرایمر(Forward و Reverse)، ۰/۲ میکرولیتر dNTPs، ۱ میکرولیتر $Mgcl_2$ و ۱unit: Taq polymerase می باشد. از سویه A. baumannii AC54/97 به عنوان کنترل مثبت ژن IMP واز P. aeruginosa PO510 به عنوان کنترل مثبت ژن bla_{VIM-1} و از P.aeruginosa 16 به عنوان سویه مثبت bla_{SPM-1} استفاده شد. جدول ۱ پرایمرهای مورد استفاده ،توالی پرایمرها و وزن مولکولی باندها را نشان می دهد(۱۷،۱۶). پرایمرهای مورد استفاده از شرکت TAG Copenhagen تهیه شد. سپس محصول PCR در ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد و به منظور شناسایی محصول نهایی PCR از ۱۰۰bp ladder شرکت GENET BIO استفاده گردید.

جدول۱. پرایمهای مورد استفاده توالی پرایمرها و وزن مولکولی باندهاجهت انجام PCR

Primer name	Reverse sequence	Reverse sequence	Amplicon size
IMP-I	ACCGCAGCAGAGTCTTTGCC	ATACCTGAGGCTCGCCACTG	587
VIM-I	ATGAAAGTGCGTGGAGAC	CACTCGTAGCCAATACC	261
SPM-1	TTGGGGATGTGAGACTAC	GCGGAACAGGATGACCTGCT	786
OXA-51	TGGATTGCACTTCATCTTGG	TAATGCTTTGATCGGCCTTG	353

یافته ها

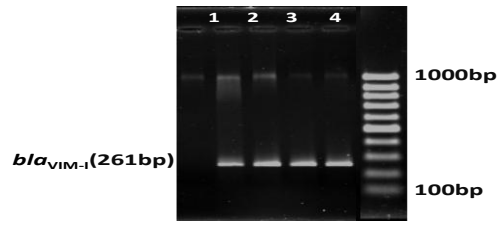
در این مطالعه از ۱۰۰ سویه بررسی شده ۵۰ سویه مقاوم به ایمی پنم از نمونه های کلینیکی شامل: خون ۵۸٪، مایع مغزی نخاعی ۸٪ ، ادرار ۴٪ ، زخم۱۲٪ و تراشه ۱۸٪ جدا شد. سویه ها ی اسینتوباکتر مقاوم به ایمیپنم ذکر شده به ترتیب از بخشهای اورژانس(۱۰ایزوله) ، ICU (۳۲ ایزوله)و پیوند مغز استخوان (۸ ایزوله) جمع آوری شد. حداقل غلظت ممانعت کنندگی(MIC) ۱۶، ۴۴، ۲۴ و ۱۶ درصد ایزوله ها به ترتیب ۳۲، ۶۴، ۱۲۸ و بیش از ۱۲۸ بود.

به منظور تعیین نوع گونه اسینتوباکتر از ژن bla_{OXA-51} که منحصرا مربوط به اسینتوباکتر بومانی است، استفاده شد. بر این اساس از مجموع ۵۰ سویه اسینتوباکتر مقاوم به ایمیپنم ۴۴ سویه متعلق به اسینتوباکتر بومانی و دارای ژن bla_{OXA-51} و ۶ سویه متعلق به گونه اسینتوباکترلوفی بودند.

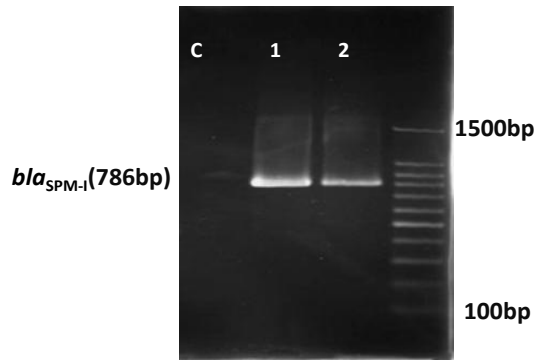
فراوانی ژن های bla_{IMP-I}, bla_{VIM-I},bla_{SPM-I} به ترتیب ۰٪، ۲۶٪ و۱۴٪ بود. در شکل ۱ و ۲ ژل الکتروفورز حاصل ازژن های bla_{VIM-I},bla_{SPM-I}نشان داده شده است. از ۵۰ سویه اسینتوباکتر مقاوم به ایمیپنم، ۱۸ سویه مولد ژن های متالوبتالاکتاماز بودند. همه این سویه ها دارای برابر یا بیش از MIC ۳۲µg/ml بودند و از این بین ۱۷ سویه متعلق به گونه اسینتوباکتر بومانی بود(جدول ۲).

جدول۲. اسینتوباکترهای مولد متالوبتالاکتاماز بر حسب محل جداسازی، میزانMIC و نوع گونه

ردیف	نمونه	محل جداسازی	bla_{Oxa-51}	ژن های متا لوبتالاکتاماز	MIC (میکروگرم/میلی لیتر)	گونه
۱	ACM_{B7}	خون	+	bla_{VIM-I}	۶۴	اسینتوباکتر بومانی
۲	ACM_{B18}	خون	+	bla_{VIM-I}, bla_{SPM-I}	۱۲۸	اسینتوباکتر بومانی
۳	ACM_{B21}	زخم	+	bla_{SPM-I}	۶۴	اسینتوباکتر بومانی
۴	ACM_{B25}	خون	+	bla_{VIM-I}, bla_{SPM-I}	۱۲۸	اسینتوباکتر بومانی
۵	ACM_{S2}	خون	+	bla_{VIM-I}	۱۲۸	اسینتوباکتر بومانی
۶	ACM_{S8}	خون	+	bla_{SPM-I}	۱۲۸	اسینتوباکتر بومانی
۷	ACM_{S21}	تراشه	+	bla_{VIM-I}	۳۲	اسینتوباکتر بومانی
۸	ACM_{S22}	خون	+	bla_{SPM-I}	۶۴	اسینتوباکتر بومانی
۹	ACM_{S24}	زخم	+	bla_{VIM-I}	۶۴	اسینتوباکتر بومانی
۱۰	ACM_{S30}	خون	+	bla_{SPM-I}	>۱۲۸	اسینتوباکتر بومانی
۱۱	ACM_{S36}	مایع مغزی نخاعی	+	bla_{VIM-I}	۳۲	اسینتوباکتر بومانی
۱۲	ACM_{S38}	خون	+	bla_{SPM-I}	۶۴	اسینتوباکتر بومانی
۱۳	ACM_{S41}	خون	–	bla_{VIM-I}	۶۴	اسینتوباکتر لوفی
۱۴	ACM_{S42}	تراشه	+	bla_{VIM-I}	۶۴	اسینتوباکتر بومانی
۱۵	ACM_{S43}	خون	+	bla_{VIM-I}	۶۴	اسینتوباکتر بومانی
۱۶	ACM_{S47}	خون	+	bla_{VIM-I}	۶۴	اسینتوباکتر بومانی
۱۷	ACM_{S49}	تراشه	+	bla_{VIM-I}	۳۲	اسینتوباکتر بومانی
۱۸	ACM_{S54}	خون	+	bla_{VIM-I}	۶۴	اسینتوباکتر بومانی



شماره (۱) کنترل :blaVIMIژن جهت شناساییPCR ●شکل۱ کنترل منفیCمثبت، شماره های(۲،۳ و۴)نمونه های مثبت و



شکل۲. PCR جهت شناسایی ژن :blaSPM-I : شماره(۱) کنترل مثبت،شماره(۲) نمونه مثبت و Cکنترل منفی

بحث

باکتری های گرم منفی مقاوم به کرباپنم ها از قبیل اسینتوباکتر مشکلات بسیاری را در درمان عفونت های ناشی از این باکتری ایجاد کرده است. این دسته از باکتری ها از مکانیسم های متعددی جهت مقاومت به داروها استفاده می کنند. یکی از مهم ترین این مکانیسم ها تولید آنزیم های متالوبتالاکتاماز است. این آنزیم ها توسط برخی از باکتری های مقاوم ترشح میشود و سبب مقاومت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام می شوند(۲). تشخیص سریع این آنزیم ها در باکتری های مقاوم به کرباپنم ها به ویژه ایمیپنم به منظور کنترل و جلوگیری از انتشار سویه های مقاوم به داروها در مراکز درمانی و هم چنین کمک به پزشکان جهت انتخاب آنتی بیوتیک مناسب جهت درمان بیماران بسیار حائز اهمیت است. سویه های مولد متالوبتالاکتامازها به دلیل پیوستگی ژنی به خانواده مختلفی از آنتی بیوتیک ها از جمله آمینوگلیکوزیدها، سولفانامیدها و کینولون ها مقاومت نشان می دهند(۲). در این مطالعه به بررسی مهم ترین آنزیم های متالوبتالاکتاماز دخیل در ایجاد مقاومت به کرباپنم ها در گونه های اسینتوباکتر پرداخته شد.

در این مطالعه از ۱۰۰ سویه اسینتوباکتر جدا شده از دو بیمارستان در تهران ۵۰٪ از سویه ها مقاومت به ایمیپنم را نشان دادند. ۴۰ درصد سویه های اسینتوباکتر مقاوم به ایمیپنم MIC برابر یا بیش از ۱۲۸µg/ml داشتند که نشانگر مقاومت بالا به این دارو در مطالعه صورت گرفته شده است. مطالعات مختلفی جهت بررسی مقاومت به این دارو در طی سالهای اخیر صورت گرفته است. شاهچراغی و همکاران در سال ۲۰۰۷ مقاومت به ایمیپنم را در ایزوله های بالینی اسینتوباکتر ۶۸/۴٪ گزارش کردند(۱۸). مطالعات فیض آبادی و همکارانش بر روی ۱۲۸ سویه اسینتوباکتر در سال های ۲۰۰۵ تا ۲۰۰۶ نشان داد که ۶۴٪ از سویه ها نسبت به آنتی بیوتیک ایمیپنم مقاوم هستند(۱۹). بنابراین نتایج به دست آمده در این مطالعه با مطالعات قبلی انجام شده بر روی سویه های اسینتوباکتر نشان دهنده شیوع اسینتوباکترهای مقاوم به ایمیپنم در سالهای اخیر است.

هم چنین در این بررسی درصد شیوع اسینتوباکتربومانی از نمونه کلینیکی خون دارای بیشترین میزان بود. براین اساس می توان گفت که این باکتری ها در ایجاد عفونت های خونی در بخش ICU نقش مهمی دارد. به طوری که باکتریمی ناشی از اسینتوباکتر آخرین عفونتی است که پس از حدود ۲ تا ۳ هفته بستری در بیمارستان در بیمار رخ می دهد.باکتریمی ناشی از این میکروارگانیسم ها در ارتباط با عفونت های دستگاه تنفسی و استفاده از کاتترهای عروقی است(۲۰،۲۱).پس از بخش ICU، حداکثر میزان نمونه از اورژانس جداسازی گردید. از جمله عواملی که در این مسئله نقش دارد، میتوان به عدم رعایت بهداشت محیط بیمارستان، آلودگی دست ها و یا حتی پوشش کارکنان ، عدم استفاده از وسایل استریل به خصوص در هنگام خون گیری و استفاده از اشاره کرد.

در این بررسی پس از خون، بیشترین میزان نمونه از تراشه جدا شد و این امر ارتباط بسیاری به استفاده از دستگاه های تنفسی مصنوعی دارد، لذا یکی از مهم ترین راه های جلوگیری از انتشار عفونت استریل کردن دستگاه های مرتبط با سیستم تنفسی می باشد.از مجموع ۵۰ سویه اسینتوباکتر مقاوم به ایمیپنم در این بررسی، ۱۸ سویه مولد ژن های متالوبتالاکتاماز بودند. از این تعداد ۱۳ سویه دارای ژن bla_{VIM-I} و ۷ سویه دارای ژن bla_{SPM-I} بودند. ژن bla_{IMP-I} در این سویه ها شناسایی نشد. تاکنون هیچ نوع گزارشی در جهان در خصوص جداسازی ژن bla_{SPM-I} از اسینتوباکتر بومانی ارائه نشده است. قابل توجه است این ژن در مطاالعات گذشته در ایران بر روی سایر باکتر ی های گرم منفی از جمله سودوموناس نیز گزارش نشده است. ژن bla_{VIM-I} نخستین بار در سال ۲۰۱۰ توسط پیمانی و همکارانش در سویه های اسینتوباکتر شناسایی گردید. در این مطالعه از مجموع ۵۴ سویه اسینتوباکتر مقاوم به ایمیپنم جدا شده از بیمارستان های تبریز، ۹ سویه مولد ژن bla_{VIM-I}شناسایی گردید(۲۲). از آنجا که در سایر سویه ها ژن های متالوبتالاکتاماز شناسایی نشده است، احتمالا سایر مکانیسم ها هم چون، بیان پمپ های تراوشی و تغییر در پروتئین های غشای خارجی در ایجاد مقاومت نسبت به ایمیپنم در این سویه ها دخیل می باشد.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این بررسی نشان دهنده مقاومت بالایی به آنتی بیوتیک ایمیپنم در نمونه های بالینی اسینتوباکتر است و MIC بالای به دست آمده به این دارو نیز موید همین مطلب است. از طرف دیگر قابلیت انتقال ژن های مقاومت از طریق عناصر متحرک ژنتیکی همچون پلاسمیدها و اینتگرون ها نقش به سزایی در افزایش شیوع این میکروارگانیسم ها و ایجاد عفونت های بیمارستانی به خصوص در بیمارانی که مدت زمان زیادی در بخش ICU بستری هستند، دارند. هم چنین تجویز نامناسب آنتی بیوتیک ها در امراض غیر باکتریایی، کامل نشدن طول مدت درمان به ایجاد سویه های اسینتوباکتر مقاوم به آنتی بیوتیک ایمیپنم کمک می کند. لذا شناسایی مکانیسم های ایجاد مقاومت در این ارگانیسم ها و به کار بستن راه کارهای مناسب در خصوص کنترل مصرف آنتی بیوتیک ها نقش مهمی را در جلوگیری از گسترش سویه های مقاوم و ایجاد عفونت های بیمارستانی توسط آنها ایفا میکند.

REFERENCES

1. Livermore DM, Woodford N. "Carbapenemases: a problem in waiting?". Current Opinion in Microbiology. 2000; 3 (5): 489–95

2. Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in gram negative aerobes. Clin Microbiol Infect. 2002; 8(6): 321-31.

3. Mendiratta DK, Deotale V, Narang P. Metallo-beta-lactamase producing Pseudomonas aeruginosa in a hospital from a rural area. Indian J Med Res. 2005; 121(5): 701-3.

4. Henrichfreise B, Wiegand I, Sherwood KJ, Wiedemann B. Detection of VIM-2 metallo-beta-lactamase in Pseudomonas aeruginosa from Germany. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49(4): 1668-9.

5. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, et al. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a Pseudomonas aeruginosa clinical isolate.Antimicrob. Agents Chemother. 1999; 43(7): 1584–90.

6. Poirel L, Magalhaes M, Lopes M, Nordmann P. Molecular analysis of metallo-beta-lactamase gene bla(SPM-1)- surrounding sequences from disseminated Pseudomonas aeruginosa isolates in Recife, Brazil. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48(4): 1406-9.

7. Queenan, A. M. & Bush, K. Carbapenamases: the Versatile β- Lactamases . Clin Microbiol Rev.2007; 20: 440-458.

8. Maragakis LL, Perl TM. Acinetobacter baumannii: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. Clin Infect Dis. 2008; 46: 1254-63.

9. Livermore DM. The threat from the pink corner. Ann Med. 2003; 35:226-34.

10. Bergogne-Berezin, 8:E. & Towner, KJ. Acinetobacter spp. AS Nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. Clin Microbiol Rev.1996; 9: 148 -165.

11. Go ES, Urban C, Burns J, Kreiswirth B, Eisner W, Mariano N, et al. Clinical and molecular epidemiology of Acinetobacter infections sensitive only to polymyxin B and sulbactam. Lancet. 1994; 344: 1329-2.

12. Fernαndez-Cuenca F, Martvnez-Martvnez L, Conejo MC, Ayala JA, Perea EJ, Pascual A. Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of Acinetobacter baumannii. J Antimicrob Chemother. 2003; 51: 565-74

13. CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Test; Approved Standard–Ninth Edition, CLSI / NCCLS M2-A9.26-1. 2006.

14. CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard–Seventh Edition, CLSI / NCCLS M7-A7.26-2. 2006.

15. Woodford N, Ellington M J, Coelho J. M, Turton J. F, Ward M. E, brownS. Multiplex PCR foe genes encodingprevalent OXA carbapenemases in Acinetobacter spp. Inter J of Antimicrob Agents.2006; 27: 351-353.

16. Shibata N, Doi Y, Yamane K, Yagi T, Kurokawa H, Shibayama K, et al. PCR typing of genetic determinants for Metallo-β-Lactamases and Integrases carried gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. J of Clin Microbiol. 2003; 41(12): 5407-5413.

17. Singh A, Goering R. V, Simjee S, Foley S. L, Zervos M. J. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. Clin Microbiol Rev. 2006; 19: 512-530.

18. Shahcheraghi F, Akbari Shahmirzadi N, Abbasalipour Bashash M, Jabbari H, Amirmozafari N. Detection of bla_{CTX}, bla_{TEM} beta- lactamase genes in clinical is Acinetobaster SPP. From selected Tehran hospitals. Iranian Journal of Medical Microbiology. 2009; 3(1): 1-9. (Full Text in Persion).

19. Feizabadi M.M, Fathollahzadeh B,Taherilhani M, Rasoolinejad M, Sadeghifard N, Aligholi M. Antimicrobial susceptibility patterns and distribiution of bla_{OXA} genes among Acinetobacter spp. Isolated from patients at Tehran hospital. Jpn. J. Infect. Dis. 2008; 61: 274-278.

20. Hartzell JD, Kim AS, Kortepeter MG, Moran KA. Acinetobacter pneumonia: a review. MedGenMed. 2007; 9:4.

21. Falagas ME, Karveli EA. The changing global epidemiology of Acinetobacter baumannii infections: a development with major public health implications. Clin Microbiol Infect. 2007; 13: 117-9

22. Amir Peymani, Mohammad-Reza Nahaei, Safar Farajnia, Alka Hasani, Akbar Mirsalehian, Nasrollah Sohrabi, et al. High Prevalence of Metallo-Beta-Lactamase-Producing Acinetobacter baumannii in a Teaching Hospital in Tabriz, Iran. Jpn. J. Infect. Dis. 2011; 64 (1): 69-71.