بررسی کلونال ایزوله های اسینتوباکتر بومانی با مقاومت چند گانه دارویی در بیمارستان امام رضا (ع) شهر تبریز

امیر پیمانی[1]، صفر فرج نیا[2*]، محمد رضا نهایی[3]، نصرا... سهرابی[4]، لاله عباسی[1]

1. میکروب شناس، استادیاربخش میکرب شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین
2. دانشیار بیوتکنولوژی مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
3. میکروب شناس، استاد بخش میکرب شناسی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
4. مربی دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

*** نشانی برای مکاتبه:** تبریز ، خیابان دانشگاه ، مجتمع تحقیق و توسعه ، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، کدپستی 51656-65811
تلفن 09143018589 دورنگار0411-3363234، farajnias@tbzmed.ac.ir
دریافت مقاله: فروردین نود یک پذیرش برای چاپ: خرداد نود یک

چکیده

سابقه و هدف: *اسینتوباکتر بومانی در حال حاضر به عنوان یکی از عوامل مهم عفونت بیمارستانی محسوب می شود. انتشار کلونال این ارگانیسم مقاوم نگرانی های زیادی را برای پزشکان و متخصصان کنترل عفونت ایجاد کرده است. این مطالعه به بررسی ملکولی ارتباط کلونال ایزوله های اسینتوباکتر بومانی با مقاومت داروئی چندگانه جمع آوری شده از بیماران بستری در بیمارستان امام رضا (ع) تبریز می پردازد .*

روش کار: *طی مدت دو سال 134 ایزوله اسینتوباکتر بومانی از نمونه های بالینی ارسالی به آزمایشگاه میکروب شناسی جمع آوری شد. ابتدا تمامی نمونه ها با استفاده از روش های استاندارد آزمایشگاهی تعیین هویت شدند و سپس از نظر حضور ژن $bla_{OXA-51-like}$، ژن اختصاصی اسینتوباکتر بومانی، بررسی شدند. الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی تمامی ایزوله ها با استفاده از روش استاندارد دیسک آگار دیفیوژن (DAD) سنجیده شد و سپس ارتباط کلونال ایزوله های با الگوی مقاومت دارویی چند گانه به روش REP-PCR بررسی شد.*

یافته ها : *تمامی ایزوله ها از نظر حضور ژن $bla_{OXA-51-like}$ مثبت بودند. از مجموع 109 ایزوله (81%) با الگوی مقاومت داروئی چندگانه، 91 ایزوله (83/5%) متعلق به ژنوتیپ A، 12 ایزوله (11%) متعلق به ژنوتیپ B و 6 ایزوله (5%) متعلق به ژنوتیپ C بودند.*

نتیجه گیری : *نتایج مطالعه حاضر نشانگر انتشار کلونال ایزوله های اسینتوباکتر بومانی با مقاومت داروئی چندگانه در بیمارستان مورد بررسی بود. با توجه به پتانسیل بالای انتشار کلونال این ارگانیسم، شناسایی سریع و استفاده از ابزارهای مناسب کنترل عفونت برای جلوگیری از انتشار بیشتر آنها ضروری می باشد .*

واژگان کلیدی: ***اسینتوباکتر بومانی، مقاومت دارویی چندگانه، REP-PCR***

مقدمه

اسینتوباکتر بومانی باسیل گرم منفی با الگوی غیرتخمیری است که در حال حاضر به عنوان یکی از عوامل مهم ایجاد کننده عفونت بیمارستانی در بخش های مختلف بیمارستان به ویژه بخش مراقبت ویژه (ICU) محسوب می شود(1). این ارگانیسم در ایجاد بیماری های مهمی از جمله اندوکاردیت ، پریتونیت ، مننژیت ، عفونت های دستگاه تنفس، سوختگی و سپتی سمی در بیماران بستری در بخش های مختلف بیمارستانی نقش دارد(2). بر اساس مطالعات انجام شده یکی از ویژگی های قابل توجه این ارگانیسم مقاومت ذاتی داروئی و یا تمایل بالای آن در کسب فاکتورهای مختلف مقاومت داروئی نسبت به آنتی بیوتیک های مصرفی در بیمارستان است . این امر در حال حاضر مشکلات فراوانی را برای پزشکان در درمان بیماران آلوده به این ارگانیسم های مقاوم ایجاد کرده است(3). در سالهای اخیر به سبب افزایش روزافزون مقاومت داروئی نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف شاهد حضور سویه هایی از این ارگانیسم با الگوی مقاومت داروئی چندگانه (Multidrug resistance-MDR) هستیم که از سراسر جهان گزارش می شود(8-4).

در تعریف اسینتوباکتر بومانی با مقاومت داروئی چندگانه به ارگانیسم هایی اطلاق می گردد که حداقل به سه کلاس آنتی بیوتیکی مهم و مصرفی از جمله داروهای بتالاکتام ، آمینوگلیکوزید و کینولون ها مقاومت نشان دهند(9).

از طرف دیگر قابلیت بالای بقای این ارگانیسم نیز امروزه متخصصان کنترل عفونت را در پاک سازی بخش های مختلف بیمارستان ها با نگرانی های زیادی مواجه ساخته است. با انجام مطالعات مختلف در زمینه بررسی اپیدمیولوژی ملکولی و تیپ بندی ایزوله های اسینتوباکتر بومانی مشخص شده است که اغلب ایزوله های مقاوم به صورت کلونال انتشار می یابند که غالبا" با مقاومت دارویی چندگانه نیز همراه هستند(۵،۱۰، 11). شناسایی انواع تیپ های باکتریایی عامل عفونت های بیمارستانی و ارتباط های مابین آنها جهت ارزیابی مخازن عفونت، چگونگی انتشار و پی بردن به راه های انتقال ارگانیسم ها اعم از طریق پرسنل، بیماران و ابزارهای پزشکی به کار رفته برای آنها در محیط بیمارستان حائز اهمیت است(12).

مطالعات گذشته نشان داده است از بین روش های ملکولی آزمون REP-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic PCR) روشی ساده، سریع و مقرون به صرفه برای ارزیابی ارتباط کلونال ایزوله های اسینتوباکتر بومانی دخیل در عفونت های بیمارستانی است که در مقایسه با آزمون استاندارد PFGE(Pulsed-Field Gel Electrophoresis) از قدرت تمایز و تکرار پذیری بالایی برخوردار است(۱۳،۱۴). هدف مطالعه حاضر تعیین ملکولی ارتباط احتمالی کلونال ایزوله های اسینتوباکتر بومانی با مقاومت دارویی چندگانه جدا شده از نمونه های بالینی جمع آوری شده از بیماران بستری در بخش های مختلف بیمارستان امام رضا (ع) شهر تبریز به روش REP-PCR بوده است.

روش کار

طی مدت دو سال در فاصله زمانی بین فروردین1387 تا فروردین 1389 تعداد 134 ایزوله اسینتوباکتر بومانی از نمونه های بالینی ارسالی به آزمایشگاه میکرب شناسی بیمارستان امام رضا(ع) در شهر تبریز جمع آوری شد . این ارگانیسم از نمونه های بالینی مختلفی از جمله تراشه، ادرار، زخم، خلط، خون، شستشوی برنش، مایع مغزی نخاعی(CSF) و مایعات آسیت و پلور و از بیماران بستری در بخش های مراقبت ویژه (ICU)، داخلی، جراحی مغز و اعصاب، عفونی، اعصاب جمع آوری شدند.

ابتدا نمونه ها با استفاده از آزمون های استاندارد میکرب شناسی و بیوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفتند . بدین ترتیب که کوکوباسیل های گرم منفی، بدون تحرک، کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی، احیاء نیترات مثبت، با توانایی رشد در دو دمای 37°C و 44°C و تولید اسید از گلوکز تنها در محیط اکسیدایتو از آزمون اکسیدایتو/فرمانتاتیو (O/F) انتخاب و برای تائید مولکولی تشخیصی مورد بررسی قرار گرفتند(15).

تمامی ارگانیسم های انتخابی از نظر حضور ژن $bla_{\text{OXA-51}}$-like که اختصاصی اسینتوباکتر بومانی است با انجام آزمون PCR مورد بررسی قرار گرفتند . برای انجام این آزمون، ابتدا DNA توتال تمامی ایزوله ها با استفاده از روش SDS-Proteinase K استخراج شدند. به طور خلاصه ابتدا 3- 4 کلنی از کشت تازه (24 ساعته) باکتری در 300 میکرولیتر از بافر TE (Tris/EDTA) کاملاً حل شدند . سپس با اضافه کردن 30 میکرولیتر SDS(10%) و 7 میکروگرم/ میلی لیتر پروتئیناز K به مدت 10 دقیقه در دمای 65°C نگهداری شدند. در ادامه مقدار 700 میکرولیتر کلروفرم به مخلوط فوق اضافه و بمدت 8 دقیقه سانتریفوژ شدند. فاز روئی به لوله جدید منتقل و پس از اضافه کردن 420 میکرولیتر ایزوپروپانول به مدت 30 دقیقه در دمای 20C- نگهداری شده و به مدت 10 دقیقه سانتریفوژ شدند. نهایتا رسوب با اتانول 70% شستشو شده و در 50 میکرولیتر محلول TE حل گردیده و به عنوان DNA الگو طی آزمون PCR استفاده شدند.

در ادامه آزمون PCR بااستفاده از پرایمرهای اختصاصی F-5´-TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG-3´و 5´-TGG ATT GCA R- CTT CAT CTT GG-3´ جهت جداسازی ژن $bla_{\text{OXA-51}}$-like مطابق روش Turton و همکارانش با اندکی تغییر انجام شد(16). بدین ترتیب که آزمون در حجم نهایی 25 میکرولیتر با استفاده از Taq PCR Master Mix، 0/2 میکرومول از هر پرایمر و 1 میکرولیتر از DNA الگو تحت شرایط زیر با استفاده از دستگاه ترمال سیکلر(اپندورف آلمان) انجام شد : دناتوراسیون اولیه (94°C به مدت 3 دقیقه)، 35 سیکل حرارتی شامل دناتوراسیون (94°C به مدت 45 ثانیه) ، اتصال پرایمر (57°C به مدت 1 دقیقه) و تکثیر (72°C به مدت 1 دقیقه) و در نهایت تکثیر نهایی (72°C به مدت 5 دقیقه). پس از انجام آزمون، محصول PCR در ژل آگارز 1/2% الکتروفورز و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید مورد بررسی قرار گرفتند. در این آزمون از سویه استاندارد اسینتوباکتر بومانی ATCC 19606 به عنوان کنترل مثبت و سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا ATCC 27853 به عنوان کنترل منفی استفاده شد. محصول PCR جهت تایید از نظر حضور ژن برای ترادف یابی(Sequencing) ارسال شدند.

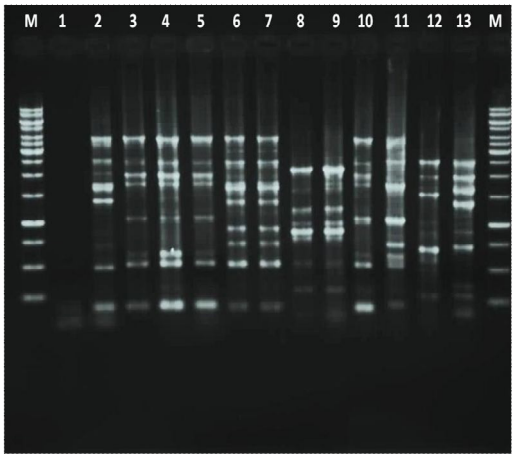
جهت شناسایی ارگانیسم های با مقاومت دارویی چندگانه حساسیت آنتی بیوتیکی تمامی ایزوله ها با استفاده از آزمون دیسک آگار دیفیوژن (DAD) به روش استاندارد کربی بوئر مطابق دستورالعمل مؤسسه استاندارد و بالینی آزمایشگاهی (CLSI) انجام شد(17). آنتی بیوتیک هایی که در این آزمون استفاده شدند عبارت بودند از : بتالاکتام ها (سفپودوکسیم، سفتریاکسون، سفتازیدیم، سفوتاکسیم) ، کرباپنم ها (ایمی پنم و مروپنم) ، کینولون ها (سیپروفلوکساسین ، لووفلوکساسین)، آمینوگلیکوزیدها (جنتامایسین و آمیکاسین) و داروهای ترکیبی (آموکسی سیلین-کلاولانیک اسید و تیکارسیلین-کلاولانیک اسید). جهت کنترل انجام آزمون از سویه های استاندارد سودوموناس آئروژینوزا ATCC 27853 و اشریشیاکلی ATCC 25922 استفاده شد.

جهت بررسی ارتباط احتمالی کلونال ایزوله های اسینتوباکتر بومانی با مقاومت دارویی چندگانه با یکدیگر آزمون REP-PCR انجام شد. جهت انجام آزمون ابتدا DNA تمامی ایزوله ها به روش مورد اشاره در بالا استخراج شدند. سپس آزمون REP-PCR مطابق روش Bou و همکارانش با اندکی تغییر و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی REP1 5´-IIIGCGCCGICATCAGGC-3´ و REP2 5´-ACGTCTTATCAGGCCTAC-3´ انجام شد(18). بدین ترتیب که آزمون در حجم نهایی 25 میکرولیتر شامل 3 میکرولیتر DNA الگو، 25 پیکومول از هر پرایمر ، 2 واحد از واحد از آنزیم DNA پلیمراز ، 2/5 میکرولیتر از بافر PCR 10X، 1 میکرولیتر $MgCl_2$ و 0/5 میکرولیتر dNTP Mix (10mM) تحت شرایط زیر انجام شد: دناتوراسیون اولیه (94°C به مدت 5 دقیقه)، 30 سیکل حرارتی شامل دناتوراسیون (94°C به مدت 1 دقیقه) ، اتصال (57°C به مدت 1 دقیقه) و تکثیر (72°C به مدت 2 دقیقه) و در نهایت تکثیر نهایی (72°C به مدت 10 دقیقه). پس از انجام آزمون، محصول PCR در ژل آگارز 1% الکتروفورز گردید. در ادامه جهت آنالیز ارتباط کلونال مابین ایزوله الگوی باندی تمامی ایزوله ها مطابق دستورالعمل مطالعه Snelling و همکارانش بررسی مقایسه ای شدند(14). بدین ترتیب که تشابه تمام باندهای قابل مشاهده و یا تفاوتی کمتر از دو باند در دو ایزوله مربوط به یک کلون یکسان در نظر گرفته شدند. در این آزمون از سویه استاندارد اسینتوباکتر بومانی ATCC 19606 به عنوان کنترل در انجام و آنالیز استفاده شد.

یافته ها

در این مطالعه ایزوله های باکتریایی به ترتیب از نمونه های آسپیره تراشه (51%-68) ، ادرار (19%-25)، زخم(8%-11)، خون(8%-11)، مایع شستشوی برنش(6%-8)، مایع مغزی-نخاعی(2%-3)، مایع پلور(2%-3)، درناژ آبسه(2%-3) ومایع آسیت (5/1%-2) جداسازی شدند. این نمونه ها از بیماران بستری در بخش های ICU (42%-56)، داخلی (27%-36)، جراحی مغز و اعصاب(15%-20)، عفونی(11%-15) و اعصاب (5%-7) جمع آوری شدند . میانگین سن بیماران51/4 سال (از14 تا 86 سال) بود. 93 بیمار (69/4%) مرد و 41 بیمار (30/6%) زن بودند.

پس از تعیین هویت فنوتیپی تمامی ایزوله ها از نظر حضور ژن $bla_{\text{OXA-51}}$-like مثبت بودند که نشان از تایید حضور اسینتوباکتر بومانی است. نتایج ترادف یابی نیز حضور ژن مورد نظر را تایید کردند. با انجام تست حساسیت آنتی بیوتیکی مشخص گردید که 109 ایزوله (81%) الگوی مقاومت داروئی چندگانه را نشان دادند و به کلاس های آنتی بیوتیکی بتالاکتام ، آمینوگلیکوزید و کینولون مقاومت داروئی کامل یا حد واسط نشان دادند. از این تعداد 74 ایزوله (68%) به ایمی پنم و 75 ایزوله (69%) به مروپنم مقاوم بودند. در ادامه با بررسی ارتباط احتمالی کلونال ایزوله های اسینتوباکتر بومانی با مقاومت داروئی چندگانه مشخص گردید که 91 ایزوله (83/5%) متعلق به ژنوتیپ A، 12 ایزوله (11%) متعلق به ژنوتیپ B و 6 ایزوله (5%) متعلق به ژنوتیپ C بودند(شکل 1). ایزوله های متعلق به ژنوتیپ A اغلب از نمونه های تراشه (49 ایزوله-54%) و ادرار (16 ایزوله-18%) و از بیماران بستری در بخش ICU (40 ایزوله-44%)و داخلی (28 ایزوله-31%) جداسازی شدند(جدول1).



شکل1. آزمون REP-PCR جهت تیپ بندی ایزوله های اسینتوباکتر بومانی با مقاومت دارویی چندگانه. ستون M مربوط به سایز مارکر(kb1)، ستون 1 کنترل منفی، ستون 2 سویه کنترل A. baumannii ATCC 19606، ستون3 تا 5 ژنوتیپA، ستون 6 و7 ژنوتیپ B، ستون 8 و9 ژنوتیپC و ستون10 تا 13 ایزوله های حساس(غیر MDR)

جدول1. فراوانی ژنوتیپ های اسینتوباکتر بومانی با مقاومت دارویی چند گانه بر حسب بخش و نوع نمونه در ایزوله های جمع آوری شده از بیمارستان امام رضا(ع) شهر تبریز

ژنوتیپ	مجموع تعداد(درصد)	منبع نمونه تعداد(درصد)						بخش بیمارستان تعداد(درصد)				
		تراشه	ادرار	زخم	خون	شستشوی برنش	سایر مایعات *	ICU	داخلی	عفونی	جراحی مغز	اعصاب
A	91 (83/5)	49(54)	16(18)	8(9)	7(8)	3(3)	8(9)	40(44)	28(31)	11(12)	9(10)	3(3)
B	12 (11)	7(58)	2(17)	1(8)	1(8)	1(8)	-	4(33)	1(8)	1(8)	5(42)	1(8)
C	6(5/5)	2(33)	2(33)	1(17)	-	1(17)	-	2(33)	2(33)	1(17)	1(17)	-

* سایر مایعات شامل: مایع پلور، مایع آسیت، درناژآبسه و مایع مغزی-نخاعی(CSF)

بحث

اسینتوباکتر بومانی با مقاومت داروئی چندگانه در حال حاضر به عنوان یکی از عوامل مهم عفونت بیمارستانی مطرح بوده و مشکلات درمانی فراوانی را در درمان بیماران آلوده به این ارگانیسم ها ایجاد کرده است . این ارگانیسم مقاوم در حال حاضر از بیماران بستری در بیمارستان های اقصی نقاط جهان گزارش می شود(8-2). با انجام مطالعات مختلف در خصوص بررسی اپیدمیولوژی ملکولی ایزوله های اسینتوباکتر بومانی مشخص شد که انتشار این ارگانیسم غالبا" به صورت کلونال صورت می گیرد که ناشی از قابلیت بقا این ارگانیسم در محیط های بیمارستانی و پتانسیل بالای کسب انواع فاکتورهای مقاومت دارویی نسبت به داروهای مصرفی است(۶،۱۹-4). از بین روشهای ملکولی که بدین منظور استفاده می شود آزمون REP-PCR از نتایج مناسب و قابل مقایسه ای با دیگرآزمون های استاندارد برخوردار است(13).

براساس نتایج حاصل از این مطالعه، 81% از ایزوله ها الگوی مقاومت داروئی چندگانه را نشان دادند که در مقایسه با مطالعه که در سال 2010 توسط Soroush و همکارانش در مرکز طبی کودکان در تهران بر روی ایزوله های اسینتوباکتر بومانی(با 40/6% الگوی مقاومت چند گانه) انجام شد (20) از آمار بالاتری برخوردار بود.

به نظر می رسد تنوع در الگوی مصرف آنتی بیوتیک های مصرفی و عدم بکارگیری ابزارهای مناسب کنترل عفونت بیمارستان باعث پیدایش و انتشار این ارگانیسم های مقاوم در بخش های مختلف بیمارستان شده است. در ادامه مشخص گردید که 68% و 69% ایزوله ها به ترتیب نسبت به ایمی پنم و مروپنم مقاومت نشان دادند که این آمار قابل توجه مقاومت نسبت به این داروها نیز می تواند به سبب گرایش پزشکان به تجویز این آنتی بیوتیک در بیماران آلوده به ارگانیسم های مقاوم باشد زیرا تمامی این بیماران سابقه تجویز و مصرف داروهای کرباپنم را داشتند. با توجه به اینکه کرباپنم ها داروهای انتخابی جهت درمان بیماران آلوده به ایزوله های اسینتوباکتر بومانی با مقاومت داروئی چندگانه هستند(21) لذا آمار بالای مقاومت نسبت به این داروها نگران کننده بوده و نشان از محدود شدن گزینه های درمانی است .

با انجام آزمون REP-PCR مشخص شد که83/5% از ایزوله های اسینتوباکتر بومانی با مقاومت داروئی چندگانه متعلق به ژنوتیپ A بودند که حاکی از انتشار کلونال و انتقال بین بخشی ایزوله های مقاوم در بیماران بستری در بخش های مختلف بیمارستان مورد مطالعه است . به نظر می رسد عدم استفاده از ابزارها و روش های مناسب کنترل عفونت در بیمارستان به عنوان محیط غنی از آنتی بیوتیک مقدمات پیدایش و انتشار روزافزون این ارگانیسم های مقاوم را فراهم ساخته است. در ادامه مشخص شد که 44 % از ازگانیسم های متعلق به ژنوتیپ A از بخش ICU جمع آوری شدند. بستری طولانی مدت بیماران و وخیم بودن بیماری، بکارگیری ابزارهای تهاجمی و مواجهه طولانی با داروهای عمده مصرفی در این بخش از جمله عوامل تأثیر گذار در حضور قابل توجه این کلون های مقاوم می باشند(23,22). همچنین مشخص شد که اغلب ایزوله های وابسته به کلون غالب(A) از نمونه های تراشه و ادرار جداسازی شدند که به نظر می رسد بکارگیری ابزارهای تهاجمی طی پروسه درمانی این بیماران از جمله تراشه و کاتتر ادراری می تواند در انتشار این کلون های مقاوم نقش داشته باشد.

تا به امروز مطالعاتی که در زمینه اپیدمیولوژی ملکولی و شناسایی کلون های اسینتوباکتر بومانی دخیل در عفونت های بیمارستانی انجام شد اغلب حاکی از وجود و انتشار کلون های مقاوم این ارگانیسم در بخش های بیمارستانی است که با نتایج حاصل از این مطالعه نیز همخوانی مناسبی دارد. در مطالعه ی که در سال2006 توسط Kraniotaki و همکارانش بر روی ایزوله های اسینتوباکتر بومانی با مقاومت دارویی چند گانه به روش REP-PCR انجام شد مشخص گردید که تمام ایزوله ها جدا شده در بیمارستان مورد مطالعه تنها متعلق به دو کلون مجزا بودند و 90% ایزوله ها مربوط به کلون غالب(A) گزارش شدند(24). در مطالعه ی دیگری که توسط Mak و همکارانش در سال 2009 در سیدنی استرالیا بر روی ایزوله های اسینتوباکتر بومانی با الگوی مقاومت دارویی چندگانه به روش REP-PCR انجام شد مشخص شد که تمام ایزوله ها متعلق به سه کلون مجزا بودند(25).

نتیجه گیری

در مجموع نتایج حاصل از این مطالعه حاکی از آمار بالای ایزوله های اسیتوباکتر بومانی با مقاومت داروئی چندگانه و انتشار آنها به شکل کلونال در بخش های مختلف بیمارستان مورد مطالعه است . لذا شناسایی سریع این کلون ها و بکارگیری ابزارهای مناسب کنترل عفونت جهت جلوگیری از انتشار هر چه بیشتر آن در بخش های مختلف بیمارستان مورد مطالعه ضروری است.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی معاونت پژوهشی و مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز انجام شده است.

REFERENCES

1. Garnacho- Montero J, Ortiz-Leyba C, Fernández-Hinojosa E, Aldabó-Pallás T, Cayuela A, Marquez-Vácaro JA, et al. Acinetobacter baumannii ventilator-associated pneumonia: epidemiological and clinical findings. Intensive Care Med 2005; 31:649-655.

2. Bergogne-Bérézin E, Towner KJ. Acinetobacter spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. Clin Microbiol Rev.1996; (2), 148-165.

3. Wybo I, Blommaert L, De Beer T, Soetens O, De Regt J, Lacor P, et al. Outbreak of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii in a Belgian university hospital after transfer of patients from Greece. J Hosp Infect. 2007; 67 (4), 374-380.

4. Zarrilli R, Casillo R, Di Popolo A, Tripodi MF, Bagattini M, Cuccurullo S, et al. Molecular epidemiology of a clonal outbreak of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii in a university hospital in Italy. Clin Microbiol Infect.2007; 13 (5), 481-489.

5. D'Arezzo S, Capone A, Petrosillo N, Visca P, GRAB, Ballardini M, et al. Epidemic multidrug-resistant Acinetobacter baumannii related to European clonal types I and II in Rome (Italy). Clin Microbiol Infect . 2009; 15 (4), 347-57.

6. Marais E, de Jong G, Ferraz V, Maloba B, Dusé AG. Interhospital transfer of pan-resistant Acinetobacter strains in Johannesburg, South Africa. Am J Infect Control. 2004; 32 (5), 278-281.

7. Scott P, Deye G, Srinivasan A, Murray C, Moran K, Hulten E, et al. An outbreak of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii-calcoaceticus complex infection in the US military health care system associated with military operations in Iraq. Clin Infect Dis.2007; 44 (12), 1577-1584.

8. Joshi SG, Litake GM, Niphadkar KB, Ghole VS. Multidrug resistant Acinetobacter baumannii isolates from a teaching hospital. J Infect Chemother. 2003; 9 (2), 187-90.

9. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. Acinetobacter baumannii: emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev.2008; 21(3), 538-582.

10. Zarrilli R, Crispino M, Bagattini M, Barretta E, Di Popolo A, Triassi M, et al. Molecular epidemiology of sequential outbreaks of Acinetobacter baumannii in an intensive care unit shows the emergence of carbapenem resistance. J Clin Microbiol. 2004; 42 (3), 946-953

11. Van Dessel H, Dijkshoorn L, van der Reijden T, Bakker N, Paauw A, van den Broek P, et al. Identification of a new geographically widespread multiresistant Acinetobacter baumannii clone from European hospitals. Res Microbiol. Mar. 2004; 155 (2), 105-112.

12. Koeleman JG, Stoof J, Biesmans DJ, Savelkoul PH, Vandenbroucke-Grauls CM. Comparison of amplified ribosomal DNA restriction analysis, random amplified polymorphic DNA analysis, and amplified fragment length polymorphism fingerprinting for identification of Acinetobacter genomic species and typing of Acinetobacter baumannii. J Clin Microbiol.1998; 36 (9), 2522-2529.

13. Bou G, Cerveró G, Domínguez MA, Quereda C, Martínez-Beltrán J. PCR-based DNA fingerprinting (REP-PCR, AP-PCR) and pulsed-field gel electrophoresis characterization of a nosocomial outbreak caused by imipenem- and meropenem-resistant Acinetobacter baumannii. Clin Microbiol Infect. 2000; 6 (12), 635-643.

14. Snelling AM, Gerner-Smidt P, Hawkey PM, Heritage J, Parnell P, Porter C, et al . Validation of use of whole-cell repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR (REP-PCR) for typing strains belonging to the Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii complex and application of the method to the investigation of a hospital outbreak. J Clin Microbiol. 1996; 34 (5), 1193-1202.

15. Feizabadi MM, Fathollahzadeh B, Taherikalani M, Rasoolinejad M, Sadeghifard N, Aligholi M, et al. Antimicrobial susceptibility patterns and distribution of bla_{OXA} genes among Acinetobacter spp. Isolated from patients at Tehran hospitals. Jpn J Infect Dis.2008; 61 (4), 274-278.

16. Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL. Identification of Acinetobacter baumannii by detection of the $bla_{OXA\text{-}51\text{-}like}$ carbapenemase gene intrinsic to this species. J Clin Microbiol. 2006; 44 (8), 2974-2976.

17. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Eighteenth informational supplement. Document M100-S18. Wayne, PA: CLSI; 2006.

18. Bou G, Cerveró G, Domínguez MA, Quereda C, Martínez-Beltrán J. PCR-based DNA fingerprinting (REP-PCR, AP-PCR) and pulsed-field gel electrophoresis characterization of a nosocomial outbreak caused by imipenem- and meropenem-resistant Acinetobacter baumannii. Clin Microbiol Infect. 2000; 6 (12), 635-643

19. Higgins PG, Dammhayn C, Hackel M, Seifert H. Global spread of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii. J Antimicrob Chemother. 2010; 65 (6), 233-238.

20.Soroush S, Haghi-Ashtiani MT, Taheri-Kalani M, Emaneini M, Aligholi M, Sadeghifard N, et al. Antimicrobial resistance of nosocomial strain of Acinetobacter baumannii in Children's Medical Center of Tehran: a 6-year prospective study. Acta Med Iran. 2010; 48(3):178-184.

21.Livermore DM. The impact of carbapenemases on antimicrobial development and therapy. Curr Opin Investig Drugs.2002; 3 (2), 218-224.

22.Jung JY, Park MS, Kim SE, Park BH, Son JY, Kim EY, et al. Risk factors for multi-drug resistant Acinetobacter baumannii bacteremia in patients with colonization in the intensive care unit. BMC Infect Dis. 200; 10, 228.

23.Shanthi M, Sekar U. Multi-drug resistant Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii infections among hospitalized patients: risk factors and outcomes. J Assoc Physicians India. 2009; 57, 638-645.

24.Kraniotaki E, Manganelli R, Platsouka E, Grossato A, Paniara O, Palù G. Molecular investigation of an outbreak of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii, with characterisation of class 1 integrons. Int J Antimicrob Agents.2006; 28 (3), 193-199.

25.Mak JK, Kim MJ, Pham J, Tapsall J, White PA. Antibiotic resistance determinants in nosocomial strains of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii. J Antimicrob Chemother. 2009 ;63(1):47-54