



Investigation of Association Between *adeA*, *adeB*, *adeI* Genes and Phenotypic Activity of Efflux Pump in Multiple Drug Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates

Negin Sedighian Kashi¹, Sahar Honarmand Jahromy^{*1}, Fahimeh Baghbani Arani²

1. Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Varamin- Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran
2. Department of Genetics and Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Varamin- Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran

Article Information

Article history:

Received: 2018/08/25
Accepted: 2018/11/04
Available online: 2018/12/22

Article Subject:

Antibiotic Resistance

IJMM 2018; 12(5): 301-310

Corresponding author:

Sahar Honarmand Jahromy
Assistant Professor of
Microbiology, Department of
Microbiology, Faculty of
Biological Sciences, Varamin-
Pishva Branch, Islamic Azad
University, Varamin, Iran

Email:

sahar_hj2@yahoo.com

Use your device to scan
and read the article online



Abstract

Background and Aims: *Acinetobacter baumannii* is a major cause of nosocomial infections and is resistant to many antibiotics. Over expression of AdeABC and AdeIJK efflux pumps in *Acinetobacter* causes resistance to aminoglycosides and decreases the sensitivity of fluoroquinolones. The aim of this study was to investigate the phenotypic activity of the *Acinetobacter baumannii* isolates associated with presence of *adeA*, *adeB*, and *adeI* genes.

Materials and Methods: The study was performed on 55 strains of *A. baumannii* isolated collected from specimens of patients hospitalized in Milad Hospital, Tehran. The isolates were diagnosed using biochemical tests and antibiotic susceptibility testing was done by disk diffusion method based on CLSI guidelines. Cartwheel method was used to study phenotypic activity of efflux pump. Multiplex PCR was used to determine the presence of genes.

Results: The prevalence of multiple drug resistant isolates was 98%. In terms of efflux pump activity 3.63% isolates were strong, 67.27% moderate and 29.09% were non-active. The frequency of *adeA*, *adeB*, *adeI* genes was 87.2%, 85.4% and 94.5%, respectively. There was significant association between *adeA* and *adeB* genes among isolates with actively and non-actively efflux pump.

Conclusions: Determination of actively phenotype of efflux pump can determine the multiple drug resistance among *A. baumannii* isolates. The results confirms the role of main genes encoding AdeABC operon, *adeA* and *adeB* in activity of *A. baumannii* efflux pump.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, Efflux pump, *adeA*, *adeB*, *adeI* genes, Multiplex PCR

Copyright © 2018 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this:

Sedighian Kashi N, Honarmand S, Baghbani Arani F. Investigation of Association Between *adeA*, *adeB*, *adeI* Genes and Phenotypic Activity of Efflux Pump in Multiple Drug Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates. Iran J Med Microbiol. 2019; 12 (5) :301-310



ارزیابی ارتباط ژن‌های *adeB, adeA* و *adeI* با فعالیت فنوتیپی پمپ تراوشی جدایه‌های *اسینتوباکتر بومانی* مقاوم چندگانه دارویی

نگین صدیقیان کاشی^۱، سحر هنرمند جهرمی^{۱*}، فهیمه باغبانی آرانی^۲

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین - پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین - پیشوا، ایران
۲- گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین - پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین - پیشوا، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و هدف: اسینتو باکتر بومانی عامل اصلی عفونت‌های بیمارستانی است. بروز سویه‌های مقاوم چندگانه دارویی یکی از دلایل عدم درمان مناسب عفونت‌های ناشی از این باکتری محسوب می‌شود. بیان بیش‌ازحد پمپ‌های تراوشی AdeABC و AdeIJK در اسینتوباکتر باعث مقاومت چندگانه دارویی نسبت به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط ژن‌های *adeI, adeB, adeA* با فعالیت فنوتیپی پمپ تراوشی ایزوله‌های مقاوم چندگانه دارویی/اسینتوباکتر بومانی است.

مواد و روش کار: مطالعه روی ۵۵ سویه اسینتوباکتر بومانی جدا شده از نمونه‌های بالینی بیماران بستری شده در بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان میلاد تهران انجام گرفت. جدایه‌ها با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی شناسایی شده و تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی با روش انتشار در دیسک و براساس دستورالعمل CLSI انجام شد. روش کارت ویل برای بررسی فعالیت فنوتیپی پمپ تراوشی به کار برده شد. برای بررسی حضور ژن‌ها از Multiplex PCR استفاده شد.

یافته‌ها: میزان مقاومت چندگانه دارویی بین جدایه‌ها ۹۸ درصد بود. از نظر فعالیت تراوشی ۳/۶۳ درصد قوی، ۶۷/۲۷ درصد متوسط، ۲۹/۰۹ درصد جدایه‌ها بدون فعالیت بودند. فراوانی ژن‌های *adeI, adeB, adeA* به ترتیب ۸۷/۲ درصد، ۸۵/۴ درصد، ۹۴/۵ درصد بود. اختلاف معناداری بین فراوانی ژن‌های *adeB* و *adeA* و بین ایزوله‌های دارای پمپ تراوشی فعال و ایزوله‌های غیرفعال وجود داشت.

نتیجه‌گیری: تعیین فنوتیپ فعال پمپ تراوشی می‌تواند تعیین‌کننده مقاومت چندگانه دارویی بین ایزوله‌های اسینتوباکتر بومانی باشد. نتایج مطالعه نقش ژن‌های اصلی اپرون *adeABC* یعنی *adeB, adeA* را در فعالیت پمپ تراوشی سویه‌های اسینتوباکتر تأیید می‌کند.

تاریخچه مقاله
دریافت: ۱۳۹۷/۰۶/۰۳
پذیرش: ۱۳۹۷/۰۸/۱۳
انتشار آنلاین: ۱۳۹۷/۱۰/۰۱
موضوع:
مقاومت پادزیستی (آنتی بیوتیکی)
IJMM1397;12(5): 301-310

نویسنده مسئول:

سحر هنرمند جهرمی

استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین - پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین - پیشوا، ایران

پست الکترونیک:

sahar_hj2@yahoo.com

کلمات کلیدی: اسینتوباکتر بومانی، پمپ تراوشی، ژن‌های *Multiplex PCR, adeI, adeB, adeA*

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبیولوژی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

کرده است (۲). سویه‌های اسینتوباکتر بومانی اغلب به دلیل قابلیت اکتساب و دریافت عناصر مقاومت، دارای مقاومت چندگانه نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف هستند. مکانیسم‌های اصلی بروز مقاومت چندگانه (Drug resistant Multiple) یا MDR نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها در اسینتوباکتر بومانی شامل بتالاکتامازها، آنزیم‌های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها، نقص در نفوذپذیری غشا، تغییر در جایگاه‌های هدف و پمپ‌های تراوشی هستند (۳،۴).

اسینتوباکتر بومانی، اصلی‌ترین پاتوژن عامل عفونت‌های بیمارستانی در سراسر جهان شناخته شده است و بیماری‌های متعددی مانند پنومونی مرتبط با ونتیلاتور، عفونت خونی، عفونت زخم و عفونت مجاری ادراری با اسینتوباکتر بومانی مرتبط هستند (۱). امروزه شیوع بالایی از سویه‌های اسینتوباکتر بومانی مقاوم به همه کلاس‌های آنتی‌بیوتیکی رایج، گزارش شده که همین مسئله درمان عفونت‌های مربوط با این باکتری را به شدت با مشکل مواجه

بیمار بستری در بخش‌های بیمارستان میلاد تهران به صورت تصادفی در تاریخ آبان تا فروردین ماه ۱۳۹۶ - ۱۳۹۵ انجام گرفت. معیار ورود بیماران به مطالعه، بستری شدن در بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان بود. نمونه‌گیری با رضایت بیمار و پس از تکمیل پرسش‌نامه انجام گرفت. کد اخلاق مربوط به نمونه‌های مطالعه شده IR.IAU.VARAMIN.REC.1397.006 است. نمونه‌های بالینی بر محیط‌های کشت بلاد آگار و مک کانگی آگار، به منظور شناسایی سویه‌های اسینتوباکتر بومانی کشت داده شده و بعد از ۴۸-۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری با رنگ‌آمیزی گرم و آزمون‌های بیوشیمیایی استاندارد مانند کاتالاز، اکسیداز، کشت در محیط‌های TSI (شرکت مرک، آلمان)، MRVP (شرکت مرک، آلمان)، اوره (شرکت مرک، آلمان) و تست‌های OF، لیزین، بایل اسکولین و رشد در دمای ۴۲ درجه سلسیوس شناسایی شدند. داروها و مداخله‌گرها در این مطالعه استفاده نشد.

تست تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی و تعیین سویه‌های مقاوم چندگانه دارویی

حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های اسینتوباکتر بومانی به روش انتشار از دیسک و براساس استانداردهای 2017 CLSI نسبت به ۱۱ آنتی‌بیوتیک با استفاده از کشت بر روی محیط مولر هینتون آگار تعیین شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی که از شرکت پادتن طب (ایران) تهیه شد، شامل آمیکاسین ۳۰ میکروگرم، ایمی‌پنم ۱۰ میکروگرم، تتراسایکلین ۳۰ میکروگرم، کوتریموکسازول ۱/۲۵-۲۳/۷۵ میکروگرم، پپراسیلین ۱۰۰ میکروگرم، جنتامایسین ۱۰ میکروگرم، سفنازیدیم ۳۰ میکروگرم، سیپروفلوکسازین ۵ میکروگرم، سفوتاکسیم ۳۰ میکروگرم، پپراسیلین تازوباکتام ۱۰۰ میکروگرم و مروپنم ۱۰ میکروگرم بود. نتایج آنتی‌بیوگرام ایزوله‌ها به صورت مقاوم، حد واسط و حساس گزارش شد. از سویه استاندارد اسینتوباکتر بومانی (ATCC19606) به عنوان سویه کنترل کیفی استفاده شد. سویه‌هایی که به بیش از ۲ کلاس آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان دادند به عنوان سویه‌های MDR معرفی شدند.

بررسی فنوتیپی فعالیت پمپ تراوشی با روش کارت

ویل

به منظور بررسی فعالیت پمپ‌های تراوشی به صورت فنوتیپی، تمامی ایزوله‌های مقاوم به چند داروی سویه‌های اسینتوباکتر بومانی با تکنیک آگار حاوی اتیدیوم بروماید با روش کارت ویل تحلیل شدند. در این روش کمترین میزان فلورسنس باکتری‌ها

سیستم‌های تراوشی باکتریایی، ترکیبات مختلف همانند آنتی‌بیوتیک‌ها را از داخل سلول جمع کرده و به بیرون سلول تراوش می‌کنند و منجر به کاهش تجمع آنتی‌بیوتیک‌ها و افزایش حداقل غلظت مهارکننده رشد (Minimum Inhibitory Concentration) آنها می‌شوند (۵). پمپ‌های تراوشی در باکتری‌ها از خانواده بزرگ تشکیل شده‌اند. از بین آنها پمپ RND (Resistance nodulation division) جزء پمپ‌های تراوشی چنددارویی و سه‌جزئی بوده که برای جابه‌جایی سوبسترا از انرژی ATP استفاده می‌کنند (۶،۷). تاکنون سه نوع پمپ تراوشی سه‌جزئی از این گروه به نام‌های AdeFGH، AdeIJK، AdeABC در اسینتوباکتر بومانی شناسایی شده است (۸). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که AdeABC بین ۵۳ تا ۹۷ درصد ایزوله‌های اسینتوباکتر بومانی وجود دارند (۹) و بیان بالای این پمپ باعث بروز مقاومت نسبت به چندین آنتی‌بیوتیک از جمله آمینوگلیکوزیدها، بتالاکتام‌ها، تتراسایکلین، فلوروکینولون، تایجی‌سیکلین، ماکرولیدها و کلرامفنیکل می‌شود (۶، ۱۰). پمپ تراوشی AdeABC شامل ژن‌های *adeA* (کدکننده پروتئین فیوژن غشایی)، *adeB* (کدکننده پروتئین ناقل چنددارویی) و *adeC* (غشای خارجی) است. این ژن‌ها از طریق سیستم‌های دوجزئی به نام *adeS* و *adeR* تنظیم می‌شوند (۱۱). با توجه به اینکه مقاومت چنددارویی می‌تواند ناشی از بیان بالای سیستم‌های تراوشی باکتریایی باشد که با خروج آنتی‌بیوتیک‌ها مانع رسیدن آنها به اهداف داخلی می‌شود، نیاز به کارگیری روش‌های مناسب برای تشخیص سریع فنوتیپ‌های مقاوم چندگانه باکتریایی وابسته به فعالیت پمپ‌های تراوشی ضروری است (۱۲). از روش‌هایی که بر پایه استفاده از یک سوبسترای مناسب فعالیت پمپ‌های تراوشی به نام اتیدیوم بروماید (EtBr) است، می‌توان به روش کارت - ویل (Cartwheel method) اشاره کرد. روش سنجش فلورومتربیک کارت - ویل بر پایه عبور اتیدیوم بروماید از عرض غشای سیتوپلاسمی و تجمع درون سلول باکتریایی است (۱۳، ۱۴). با توجه به زیادبودن میزان حضور ژن‌های پمپ تراوشی بین ایزوله‌های اسینتوباکتر بومانی هدف از مطالعه حاضر بررسی ارتباط ژن‌های *adeA*، *adeB*، *adeI* با فعالیت فنوتیپی پمپ تراوشی ایزوله‌های مقاوم چندگانه دارویی اسینتوباکتر بومانی است.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه

این مطالعه مقطعی - توصیفی روی ۵۵ سویه اسینتوباکتر بومانی ایزوله‌شده از نمونه‌های بالینی شامل تراشه و زخم ۲۳۰

ATCC25922 به عنوان سویه کنترل منفی پمپ تراوشی استفاده شد (۱۵،۱۶).

تکثیر ژن های *adeA* و *adeB* و *adeI*

به منظور استخراج DNA همه جدایه های *اسینتوباکتر بومانی* از کیت استخراج DNA باکتری گرم منفی (شرکت سیناژن، ایران) استفاده شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با روش اسپکتوفتومتری بررسی شد و برای تکثیر و بررسی فراوانی ژن های *adeA* و *adeB* و *adeI* از پرایمرهای اختصاصی رفت و برگشتی استفاده شد که در جدول ۱ نشان داده شده است. تکثیر ژن *16SrRNA* به عنوان کنترل داخلی و تأیید سویه های *اسینتوباکتر بومانی* استفاده شد. واکنش Multiplex PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱X بافر PCR (۱۰×) (شرکت سیناکلون، ایران)، ۲ میلی مولار $MgCl_2$ ، ۰/۳ میلی مولار dNTP (شرکت سینا کلون، ایران)، ۱/۵ واحد آنزیم TaqDNA polymerase (شرکت سینا کلون، ایران)، ۲۰ پیکومول از هر یک از پرایمرها و ۱۰۰ نانوگرم DNA باکتریایی انجام گرفت. برنامه دمایی و زمانی PCR شامل مرحله واسرشت اولیه ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، مرحله واسرشت ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵۵ ثانیه، مرحله اتصال ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۵۵ ثانیه، مرحله بسط ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه در ۳۲ سیکل و مرحله بسط نهایی ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه بود. برای بررسی محصولات PCR نمونه ها روی ژل آگارز ۱ درصد انتقال داده شده و بعد از رنگ آمیزی در دستگاه ژل داک بررسی شد.

باید تعیین شود. ابتدا محلول پایه اتیدیوم بروماید (شرکت مرک، آلمان) در آب مقطر و به غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر تهیه شده و در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد. کشت شبانه روزی از سویه های *اسینتوباکتر بومانی* در ۵ میلی لیتر محیط کشت مایع تهیه شد و پس از ۲۴ ساعت غلظت آن با PBS به استاندارد ۰/۵ مک فارلند رسانده شد. پلیت های حاوی محیط کشت نوترینت آگار (شرکت مرک، آلمان) همراه با غلظت های اتیدیوم بروماید از ۰/۲۵ تا ۲/۵ میلی گرم بر لیتر آماده شد و در مقابل نور محافظت شد. یکی از پلیت ها فاقد اتیدیوم بروماید بود. سویه های مقاوم به چند دارو، روی پلیت های نوترینت آگار حاوی غلظت های متفاوت اتیدیوم بروماید به صورت یک خط از مرکز محیط به سمت کنار آن کشت داده شدند. غلظت ها وابسته به نوع باکتری بوده و تغییردانی هستند. کمترین غلظت ممانعت کننده رشد نیز ۲ میلی گرم در لیتر در نظر گرفته شد. پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شدند. هر پلیت نوترینت آگار حاوی یک غلظت از اتیدیوم بروماید، می تواند شامل ۱۲ جدایه باکتری باشد. میزان فلوروسنت هر جدایه با دستگاه ژل داک (شرکت کیاژن ساخت ایران) اندازه گیری شد تا کمترین غلظت اتیدیوم بروماید مؤثر بر باکتری مشخص شود. کنترل مثبت شامل سویه هایی هستند که بیشترین میزان فلوروسنس را دارند (از نظر فعالیت تراوشی غیرفعال هستند) و کنترل منفی شامل سویه هایی که هیچ فلوروسنتی نشان نمی دهند (از نظر فعالیت تراوشی مثبت هستند). *استافیلوکوکوس اورئوس*

جدول ۱. توالی پرایمرهای به کاررفته در این مطالعه

| نام پرایمر | توالی پرایمر (۵' - ۳') | طول محصول PCR | منبع |
|------------------|----------------------------------|---------------|------|
| <i>16SrRNA-F</i> | 5'-GAC GTA CTC GCA GAA GC-3' | 426bp | 17 |
| <i>16SrRNA-R</i> | 5'-TTA GTC TTG CGA CCG TAC TC-3' | 426bp | 17 |
| <i>adeA-F</i> | 5'ATC TTC CTG CAC GTG TAC AT-3' | 513bp | 18 |
| <i>adeA-R</i> | 5'-GGC GTT CAT CAC TAA CC-3' | 513bp | 18 |
| <i>adeB-F</i> | 5'-GTA TGA ATT GAT GCT GC-3' | 979bp | 18 |
| <i>adeB-R</i> | 5'-CAC TCG TAG CCA ATA CC-3' | 979bp | 18 |
| <i>adeI-F</i> | 5'-ATC GG CTT GTT GGT TGT AG-3' | 541bp | 19 |
| <i>adeI-R</i> | 5'-AAG CAC CAG CCG TTA CTG AA-3' | 541bp | 19 |

آنالیز آماری

برای آنالیز آماری داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ استفاده شد. آزمون مربع کای (χ^2 test) برای بررسی ارتباط بین فعالیت فنوتیپی پمپ تراوشی با فراوانی ژن‌های *adeB* *adeA* و *adeI* استفاده شد. سطح معناداری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

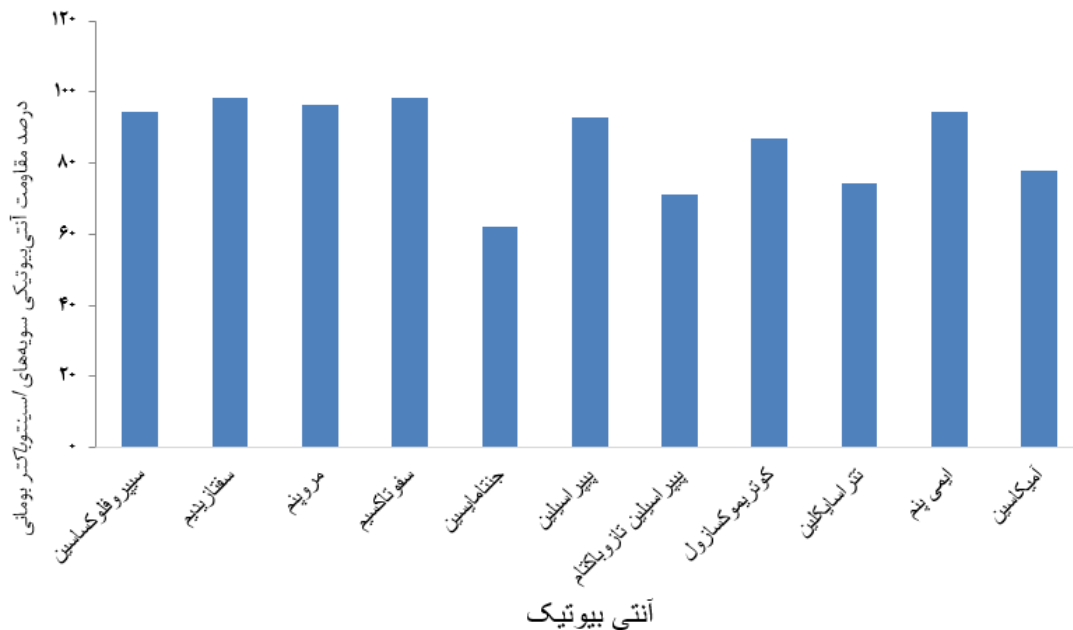
یافته‌ها

از ۵۵ سویه *اسینتوباکتر بومانی* شناسایی شده، ۵۳ نمونه از بخش مراقبت‌های ویژه و ۲ نمونه از سایر بخش‌ها جداسازی شدند. ۴۹ (۸۹ درصد) سویه‌ها مربوط به نمونه تراشه بیماران بودند و ۶ (۱۰/۹ درصد) سویه‌ها از نمونه زخم جداسازی شدند. ۲۵ (۴۵/۴ درصد) سویه از نمونه بالینی مردان و ۳۰ (۵۴/۴ درصد) سویه‌ها از نمونه بالینی زنان جدا شدند.

نتایج حاصل از روش انتشار در دیسک برای ایزوله‌های

اسینتوباکتر بومانی

با توجه به نتایج به دست آمده از نمودار ۱، درصد فراوانی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفنازیدیم، سفوتاکسیم، مروپنم، سیپروفلوکساسین، ایمی‌پنم، پپیراسیلین، کوتریموکسازول، آمیکاسین، تتراسایکلین، پپیراسیلین تازوباکتام، جنتامایسین به ترتیب شامل ۹۸/۲ درصد، ۹۸/۲ درصد، ۹۶/۴ درصد، ۹۴/۵ درصد، ۹۴/۵ درصد، ۷۱ درصد، ۶۲ درصد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها گزارش شد. ۹۸ درصد سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* به ۳ کلاس آنتی‌بیوتیکی مقاومت نشان دادند و به‌عنوان سویه‌های MDR انتخاب شدند.



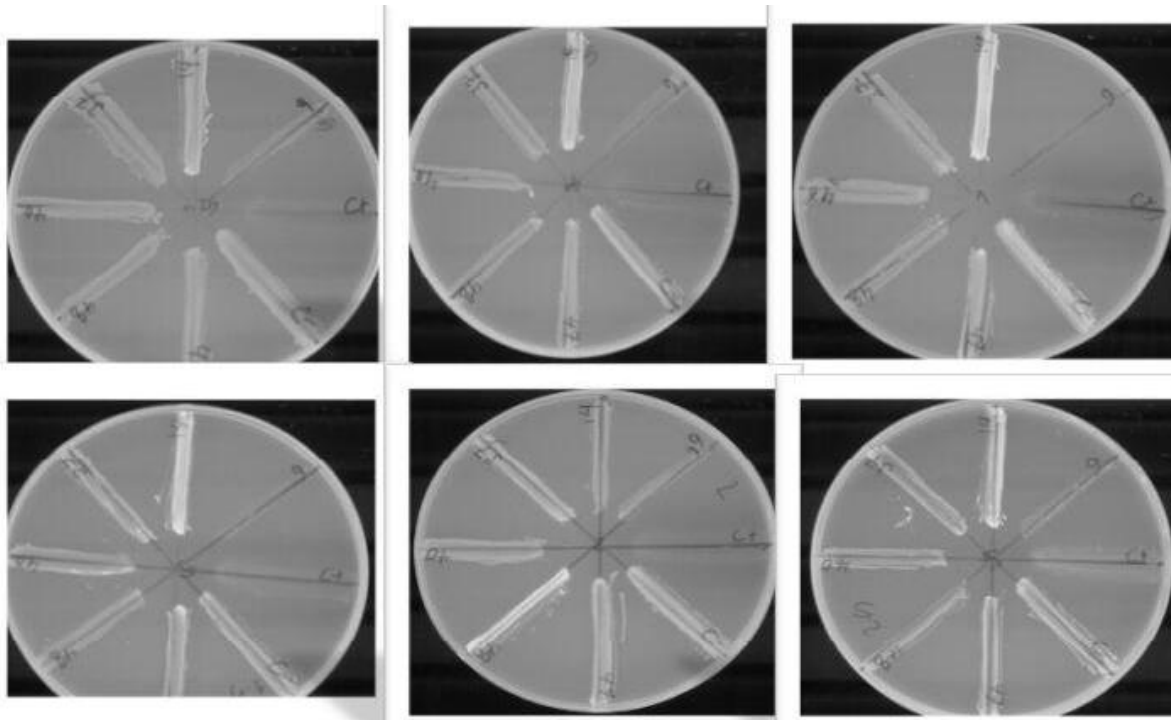
نمودار ۱. الگوی مقاومت سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها

تراوشی بودند. سویه‌هایی که در هیچ‌یک از غلظت‌های اتیدیوم بروماید خاصیت فلورسنت نداشتند، به‌عنوان سویه‌های فعال شدید پمپ تراوشی در نظر گرفته شدند (۱۶) (شکل ۱).

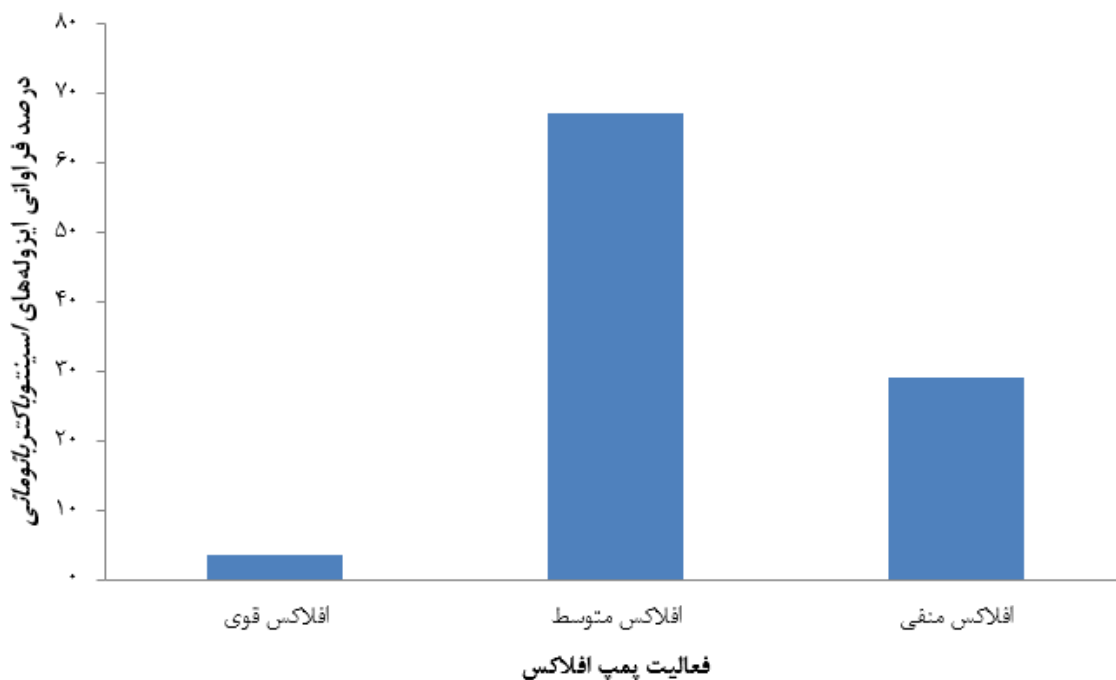
نتایج نشان داد که بین جدایه‌های *اسینتوباکتر* از نظر فعالیت پمپ تراوشی به روش کارت ویل به ترتیب، ۱۶ سویه (۲۹/۰۹ درصد) افلاکس منفی، ۲ سویه افلاکس قوی (۳/۶۳ درصد) و ۳۷ سویه (۶۷/۲۷ درصد) دارای افلاکس متوسط بودند که در نمودار ۲ نشان داده شده است.

نتایج تشخیص فنوتیپ فعال پمپ تراوشی سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* به روش کارت ویل

برای تشخیص فعالیت پمپ تراوشی سویه‌های *اسینتوباکتر*، همه ایزوله‌های مورد مطالعه با تکنیک آگار حاوی اتیدیوم بروماید و روش چرخ‌دنده‌ای یا کارت ویل کشت داده شد. سویه‌هایی که کمترین غلظت اتیدیوم برومایدی که در آن خاصیت فلورسنت نشان می‌دادند ۰/۲۵ بود، فاقد فعالیت تراوشی و سویه‌هایی که کمترین غلظت اتیدیوم بروماید آنها ۰/۲۵ نبود، دارای فعالیت



شکل ۱. تصاویر فلورسنت پلیت های حاوی غلظت های اتیدیوم بروماید (۲/۵-۲۵/۰) و سوسپانسیون سویه های مختلف *اسینتوباکتر بومانی*: سویه شماره ۹ به عنوان سویه فعال انتخاب شد؛ همه سویه ها به جز سویه شماره ۹ در همه غلظت ها فلورسنت نشان دادند و به عنوان سویه غیرفعال در نظر گرفته شدند.



نمودار ۲. میزان فعالیت پمپ تراوشی یا افلاکس سویه های MDR/*اسینتوباکتر بومانی* به روش کارت ویل

تراوشی نشان داد که از ۳۷ سویه با فعالیت متوسط پمپ تراوشی ۳۱ (۸۳/۷۸ درصد) سویه دارای ژن *adeA*، ۳۳ (۸۹/۱۸ درصد) سویه دارای ژن *adeB* و ۳۴ (۹۱/۸۹ درصد) سویه دارای ژن *adeI* هستند. بین فنوتیپ فعال متوسط پمپ تراوشی با حضور ژن‌های *adeA*، *adeB* و *adeI* ارتباط معناداری مشاهده نشد ($P > 0.05$). از ۱۸ سویه غیرفعال پمپ تراوشی، فقط ۱ سویه (۵/۵۵ درصد) دارای ژن *adeA*، ۳ سویه (۱۶/۶۶ درصد) دارای ژن *adeB* و همه سویه‌ها (۱۰۰ درصد) دارای ژن *adeI* بودند. اختلاف معناداری بین وجود ژن‌های *adeA* و *adeB* در ایزوله‌های فعال از نظر پمپ تراوشی و ایزوله‌های غیرفعال وجود داشت ($P = 0.002$).

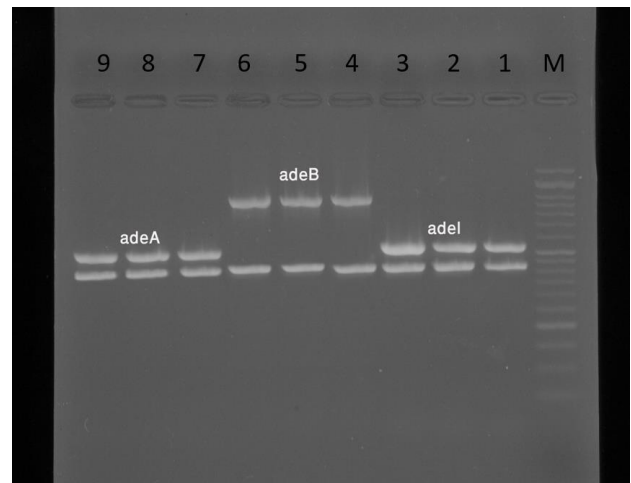
بحث و نتیجه‌گیری

گسترش مقاومت چندگانه آنتی‌بیوتیکی که یکی از عوامل اصلی نقص درمان عفونت‌های ناشی از باکتری *اسینتوباکتر بومانی* است. مشکل اساسی مراکز درمانی و بیمارستان‌ها محسوب می‌شود. *اسینتوباکتر بومانی* به دلیل سرعت سریع مقاومت، افزایش شیوع و انتشار جهانی سویه‌های مقاوم چندگانه دارویی به‌عنوان یک زنگ خطر شناخته شده است. امروزه نقش پمپ‌های تراوشی در بروز چنین مقاومتی بسیار مطالعه و تأیید شده است (۱۷، ۱۸). در تحقیق حاضر نتایج تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان میلاد تهران نشان داد که بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی* به ترتیب مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های سفترایم و سفوتاکسیم (۹۸/۲ درصد)، مروپنم (۹۶/۴ درصد)، سیپروفلوکساسین و ایمپنم (۹۴/۵ درصد) و کمترین میزان مقاومت مربوط به جنتامایسین (۶۲ درصد) بود. در مطالعه صورت‌گرفته از سوی Rahbar و همکاران (۲۰۱۰) ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی* به اغلب آنتی‌بیوتیک‌های مطالعه‌شده، از جمله سفوتاکسیم (۹۰/۹ درصد)، جنتامایسین (۸۵/۲ درصد)، پیراسیلین (۹۰/۹ درصد) و آمیکاسین (۸۵/۲ درصد) مقاومت نشان دادند (۱۹). در ایران مطالعات نشان داده که مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* روزبه‌روز در حال افزایش است؛ به‌طوری که در مطالعه سامانمند Moradi و همکاران (۲۰۱۵)، میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مروپنم و ایمپنم که بین سال‌های ۲۰۰۷ - ۲۰۰۱، ۶۴/۳ درصد و ۵۱/۱ درصد بود، به ۸۱/۵ درصد و ۷۶/۵ درصد بین سال‌های ۲۰۱۳ - ۲۰۱۲ افزایش یافته است (۲۰). در مطالعه حاضر نیز که در سال ۲۰۱۷ صورت

نتایج بررسی حضور ژن‌های *adeA*، *adeB* و *adeI*

پس از تکثیر ژن‌های *adeA*، *adeB* و *adeI* برای همه سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی*، محصولات PCR به‌صورت باندهایی به‌اندازه ۵۱۳ جفت باز برای ژن *adeA* و ۹۷۹ جفت باز برای ژن *adeB* و ۵۴۱ جفت باز برای ژن *adeI* روی ژل آگاروز ۱ درصد مشاهده شد. محصول تکثیر ژن 16SrRNA به‌صورت باند با اندازه ۴۲۶ جفت باز مشخص شد (شکل ۲).

نتایج حاصل از Multiplex PCR میزان فراوانی ژن‌های کدکننده پمپ تراوشی را به این صورت نشان داد که ژن *adeA* در ۴۸ سویه (۸۷/۲ درصد) ژن *adeB* در ۴۷ (۸۵/۴ درصد) و ژن *adeI* از اپرون AdeIJK در ۵۲ (۹۴/۵ درصد) وجود دارد. از طرفی بررسی فراوان هم‌زمان ژن‌ها نشان داد که ترکیب ژنی *adeA-adeB* در ۴۰ (جداً *اسینتوباکتر بومانی* ۷۲/۷۲ درصد)، *adeA-adeI* در ۴۵ (جداً ۸۱/۸۱ درصد)، *adeB-adeI* در ۴۷ (جداً ۸۵/۴۵ درصد) و هم‌زمانی سه ژن *adeA-adeB-adeI* در ۷۲/۷۲ درصد جداها گزارش شد.



شکل ۲. تصویر الکتروفورز به‌منظور بررسی حضور ژن‌های *adeA*، *adeB* و *adeI* و 16SrRNA

چاهک‌های شماره ۱-۳ حاوی باند مربوط به ژن *adeI* (۵۴۱ bp). چاهک‌های شماره ۴-۶ حاوی باند مربوط به ژن *adeB* (۹۷۹ bp). چاهک‌های شماره ۷-۹ حاوی باند مربوط به ژن *adeA* (۵۱۳ bp). همه چاهک‌ها حاوی باند مربوط به ژن 16SrRNA (۵۰۰ bp) سایز مارکر M

ارتباط فراوانی ژن‌های *adeA*، *adeB* و *adeI* با

فعالیت پمپ تراوشی در سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی*

نتایج بررسی فراوانی ژن‌های پمپ تراوشی *adeA*، *adeB* و *adeI* در سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* براساس فعالیت پمپ

نتایج کوتاه است و می‌تواند برای جداسازی تعداد زیادی از جدایه‌های باکتریای مقاوم دارای پمپ تراوشی به کار برده شود. بنابراین تشخیص جدایه‌های باکتریایی گرم مثبت و گرم منفی دارای فنوتیپ MDR را آسان‌تر می‌کند (۲۴). پمپ‌های تراوشی سه‌جزئی AdeABC و AdeIJK که در غشای خارجی باکتری گرم منفی *اسینتوباکتر بومانی* قرار دارند و توسط ژن‌های کدکننده آنها بیان می‌شوند، نقش مهمی در ایجاد مقاومت چندگانه آنتی‌بیوتیکی در باکتری دارند (۲۵، ۲۶). در این تحقیق فراوانی ژن‌های *adeA* و *adeB* از اپرون AdeABC و ژن *adeI* از اپرون AdeIJK در سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* مطالعه شد. ۸۷/۲ درصد سویه‌ها ژن *adeA* ۸۵/۴ درصد ژن *adeB* و ۹۴/۵ درصد ژن *adeI* داشتند. Jasim و همکاران (۲۰۱۶) گزارش دادند که ۱۰۰ ایزوله *اسینتوباکتر مطالعه‌شده*، دارای ژن *adeB* بودند و ژن‌های *adeA* و *adeC*، هریک با فراوانی ۷۷/۴ و ۸۳/۳ درصد بین ایزوله‌ها یافت شدند (۲۷). مطالعه پیشین Gaponi Nejad و همکاران (۲۰۱۴) نشان داد که در یک جمعیت ۱۵۶ ایزوله‌ای *اسینتوباکتر بومانی* مقاوم به چند دارو، فراوانی ژن‌های *adeA*، *adeB* و *adeC* به ترتیب ۱۰۰ درصد، ۱۰۰ درصد و ۹۶/۵ درصد است (۲۸). مطالعه دیگری از سوی Gholami و همکاران (۲۰۱۵) روی ۶۰ ایزوله *اسینتوباکتر بومانی* جداشده از بخش‌های سوختگی، فراوانی ژن‌های *adeA* و *adeB* را ۱۰۰ درصد و فراوانی ژن *adeC* را ۸۵ درصد گزارش داد (۲۹). طی مطالعه Kor و همکاران (۲۰۱۳) اغلب ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی* بیمارستان‌های مالزی حاوی ژن‌های *adeA* و *adeI* بودند (۳۰). در آن مطالعه نیز فراوان‌ترین ژن *adeA* بود. این نتایج با نتایج سایر مطالعات که در آنها نیز شیوع بالایی از AdeABC بین سویه‌های *اسینتوباکتر* گزارش شده، مشابه است. همچنین فراوانی ژن‌های *adeI* و *adeJ* نیز در مطالعه Kor، بالا گزارش داده شد (۳۰). علت فراوانی شیوع ژن‌های *adeA* و *adi* در تحقیق حاضر را می‌توان حضور هم‌زمان سیستم‌های تراوشی کدکننده از طریق این ژن‌ها در *اسینتوباکتر بومانی* بیان کرد. این نتیجه با نتایج دیگری که حضور هم‌زمان هر دو گروه پمپ تراوشی خانواده RND و نقش آنها در مقاومت آنتی‌بیوتیکی در اغلب ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی* را گزارش داده است، شباهت دارد (۳۱). در مطالعه حاضر، از ۳۷ جدایه با فعالیت متوسط پمپ تراوشی، ۳۱ جدایه (۸۳/۷۸ درصد) دارای ژن *adeA*، ۳۳ جدایه (۸۹/۱۸ درصد) دارای ژن *adeB* و ۳۴ جدایه (۹۱/۸۹ درصد) دارای ژن *adeI* بودند. بین فنوتیپ با فعالیت متوسط پمپ تراوشی با حضور ژن‌های *adeA*، *adeB* و *adeI* ارتباط معناداری مشاهده نشد

پذیرفته، مقاومت به این دو آنتی‌بیوتیک حدود ۹۰ درصد است که خود تأییدی بر افزایش میزان مصرف آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی و رشد میزان مقاوت باکتری در برابر این آنتی‌بیوتیک‌ها در ایران است. همچنین شیوع سویه‌های MDR *اسینتوباکتر بومانی* از ۵۰ درصد بین سال‌های ۲۰۰۷ - ۲۰۰۱ به ۷۴ درصد در سال‌های ۲۰۱۱ - ۲۰۱۰ افزایش یافته است (۲۰). Safari و همکاران (۲۰۱۵) میزان مقاومت سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* ایزوله‌شده از بیمارستان‌های همدان را در برابر آنتی‌بیوتیک‌های ایمپنم، مروپنم، سیپروفلوکساسین، آمیکاسین، پیراسیلین تازوباکتام و سفوتاکسیم را به ترتیب ۸۵ درصد، ۹۴ درصد، ۹۷ درصد، ۸۴ درصد، ۹۵ درصد و ۹۸ درصد گزارش دادند (۲۱). در مطالعه حاضر، میزان فراوانی بالایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مروپنم و ایمپنم گزارش شد که نشان از افزایش شیوع سویه‌های مقاوم کارباپنم دارد. از طرفی فراوانی سویه‌های MDR *اسینتوباکتر بومانی* در این مطالعه، بالا و ۹۸ درصد گزارش شد که نسبت به مطالعات گذشته افزایش چشمگیری داشته است. مقاومت وابسته به پمپ تراوشی که در بسیاری از باکتری‌ها شناخته شده، از مهم‌ترین مکانیسم‌های مقاومت ذاتی و اکتسابی آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری‌ها است (۲۲). بیان بیش‌ازحد سیستم‌های تراوشی از نوع کروموزومی خانواده RND، مانند اپرون *adeABC* همراه با سوبستراهای اختصاصی عامل مهمی در پیدایش *اسینتوباکتر* مقاوم چندگانه هستند (۸). روش کارت ویل - اتیدیوم بروماید برای تشخیص سریع سویه‌های باکتریایی MDR وابسته به پمپ تراوشی یک روش ساده و مناسب است (۲۳). در مطالعه حاضر روش کارت ویل برای تعیین فعالیت فنوتیپی پمپ تراوشی در ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی* استفاده شد. به ترتیب، ۱۶ سویه (۲۹/۰۹ درصد) که کمترین غلظتی را که در آن فلورسنت نشان دادند ۰/۲۵ بود. افلاکس منفی، ۲ سویه که در هیچ غلظتی از اتیدیوم بروماید فلورسنت نشدند افلاکس قوی (۳/۶۳ درصد) و ۳۷ سویه (۶۷/۲۷ درصد) دارای افلاکس متوسط بودند. در واقع فعالیت فنوتیپی ۷۰ درصدی پمپ تراوشی بین ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی* نشانگر بروز سویه‌های MDR با شیوع بالا در این باکتری است. Martins و همکاران (۲۰۱۱) با مطالعه روی گروهی از باکتری‌های گرم منفی مانند *اسینتوباکتر بومانی* و باکتری‌های گرم مثبتی مانند *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان دادند که روش کارت ویل - اتیدیوم بروماید، روش مناسب برای تعیین فعالیت پمپ تراوشی در باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی است. این متد از نظر روش کار، ساده بوده و زمان انجام آن و رسیدن به

آنتی‌بیوتیکی بین ایزوله‌ها در نقاط مختلف جغرافیایی است که باید در کانون توجه قرار گیرد. تعیین میزان بیان این ژن‌های کدکننده پمپ‌های تراوشی در بین ایزوله‌های فعال از نظر فنوتیپی نیز حائز اهمیت است و نقش سینرژی بین پمپ‌های تراوشی با سایر مکانیسم‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی برای رسیدن به این میزان بالای مقاومت در بین ایزوله‌های اسینتوباکتر بومانی نباید نادیده گرفته شود و به مطالعات بیشتری در این زمینه نیاز است.

سیاسگزاری

بدین‌وسیله از مسئول و کارشناسان محترم آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا و جناب آقای امید حسینی کارشناس آزمایشگاه جامع تحقیقاتی دانشگاه شهید بهشتی که ما را در اجرای این پژوهش یاری کردند، تقدیر و تشکر می‌شود.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

($P > 0.05$). از ۱۸ سویه غیرفعال پمپ تراوشی، فقط ۱ جدایه (۵/۵۵ درصد) دارای ژن *adeA* ۳ جدایه (۱۶/۶۶ درصد) دارای ژن *adeB* و همه جدایه‌ها (۱۰۰ درصد) دارای ژن *adeI* بودند. اختلاف معناداری بین وجود ژن‌های *adeA* و *adeB* در ایزوله‌های فعال از نظر پمپ تراوشی و ایزوله‌های غیرفعال وجود داشت (این امر نشان‌دهنده حضور و اهمیت اپرون $P=0.002$). AdeABCD در فعالیتهای پمپ‌های تراوشی در اسینتوباکتر بومانی است؛ زیرا در نبود ژن‌های کدکننده این اپرون یعنی *adeA* و *adeB* سویه‌های اسینتوباکتر بومانی مطالعه شده، فعالیت تراوشی نداشتند. در این تحقیق تعیین بیان و میزان بیان ژن‌های کدکننده پمپ افلاکس در بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی انجام نگرفته است که در مطالعات آینده باید توجه بیشتری به آن شود.

به‌طور کلی تعیین فنوتیپ فعال پمپ تراوشی می‌تواند تعیین‌کننده مقاومت چندگانه دارویی، بین ایزوله‌های اسینتوباکتر بومانی باشد. از طرفی شیوع بالای ژن‌های کدکننده پمپ‌های تراوشی در اسینتوباکتر بومانی یکی از عوامل مهم انتشار مقاومت

References

1. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. Acinetobacter baumannii: emergence of a successful pathogen. *Clinical microbiology reviews*. 2008; (3): 538-82. <https://doi.org/10.1128/CMR.00058-07>
2. Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. Global challenge of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007; 51(10): 3471-84. <https://doi.org/10.1128/AAC.01464-06>
3. Gordon NC, Wareham DW. Multidrug-resistant Acinetobacter baumannii: mechanisms of virulence and resistance. *Int j antimicrob ag*. 2010; 35(3): 219-26. <https://doi.org/10.1345/aph.1P084>
4. Esterly JS, Richardson CL, Eltoukhy NS, Qi C, Scheetz MH. Genetic mechanisms of antimicrobial resistance of Acinetobacter baumannii. *Ann Pharmacother*. 2011; 45(2): 218-28.
5. Van Bambeke F, Balzi E, Tulkens PM. Antibiotic efflux pumps. *Biochemical pharmacology*. 2000; 60(4): 457-70. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(00\)00291-4](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(00)00291-4)
6. Schneiders T, Findlay J, Amyes SG. Efflux Pumps in Acinetobacter baumannii. *Acinetobacter Biology and Pathogenesis*. 2008; 105-27. https://doi.org/10.1007/978-0-387-77944-7_6
7. Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2005; 56(1): 20-51. <https://doi.org/10.1093/jac/dki171>
8. Coyne S, Courvalin P, Périchon B. Efflux-mediated antibiotic resistance in Acinetobacter spp. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011; 55(3): 947-53. <https://doi.org/10.1128/AAC.01388-10>
9. Coyne S, Rosenfeld N, Lambert T, Courvalin P, Périchon B. Overexpression of resistance-nodulation-cell division pump AdeFGH confers multidrug resistance in Acinetobacter baumannii. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010; 54(10): 4389-93. <https://doi.org/10.1128/AAC.00155-10>
10. Pannek S, Higgins PG, Steinke P, Jonas D, Akova M, Bohnert JA, et al. Multidrug efflux inhibition in Acinetobacter baumannii: comparison between 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenyl-arginine-β-naphthylamide. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2006; 57(5): 970-4. <https://doi.org/10.1093/jac/dki081>
11. Marchand I, Damier-Piolle L, Courvalin P, Lambert T. Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in Acinetobacter baumannii is regulated by the AdeRS two-component system. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2004; 48(9): 3298-304. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.9.3298-3304.2004>
12. Piddock LJ. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria.

- Clinical microbiology reviews. 2006; 19(2): 382-402. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.2.382-402.2006>
13. Pumps E, Cost F, RamA B. Efflux pumps of gram-negative bacteria: genetic responses to stress and the modulation of their activity by pH, inhibitors, and phenothiazines. *Adv enzymol relat area mol biol*. 2011; 238-61.
 14. Amaral L, Cerca P, Spengler G, Machado L, Martins A, Couto I, et al. Ethidium bromide efflux by *Salmonella*: modulation by metabolic energy, pH, ions and phenothiazines. *International journal of antimicrobial agents*. 2011; 38(2): 140-5. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.03.014>
 15. Gooyandeh Sh, Honarmand JS, Noorbakhsh F. Evaluation of efflux pump activity among uropathogenic *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* multiple-drug resistance isolates. *International Journal of Molecular and Clinical Microbiology*. 2016; 6(2): 708-14.
 16. Martins M, Matthew P, Viveiros M, Couto I, Fanning S, Pag JM, Amara L. A Simple Method for Assessment of MDR Bacteria for Over-Expressed Efflux Pumps. *Open Microbiol J*. 2013; 7: 72–82. <https://doi.org/10.2174/1874285801307010072>
 17. Louie L, Goodfellow J, Mathieu P, Glatt A, Louie M, Simor A. Rapid detection of methicillin-resistant staphylococci from blood culture bottles by using a multiplex PCR assay. *Journal of clinical microbiology*. 2002; 40(8): 2786-90 <https://doi.org/10.1128/JCM.40.8.2786-2790.2002>.
 18. Liu B, Liu Y, Di X, Zhang X, Wang R, Bai Y, et al. Colistin and anti-Gram-positive bacterial agents against *Acinetobacter baumannii*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2014; 47(4): 451-6. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0081-2014>
 19. Rahbar M, Mehrgan H, Aliakbari NH. Prevalence of antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* in a 1000-bed tertiary care hospital in Tehran, Iran. *Indian J Pathol Microbiol*. 2010; 53(2): 290. <https://doi.org/10.4103/0377-4929.64333>
 20. 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): 7986.
 21. Safari M, Nejad ASM, Bahador A, Jafari R, Alikhani MY. Prevalence of ESBL and MBL encoding genes in *Acinetobacter baumannii* strains isolated from patients of intensive care units (ICU). *Saudi journal of biological sciences*. 2015; 22(4): 424-9.
 22. Vargiu AV, Nikaïdo H. Multidrug binding properties of the AcrB efflux pump characterized by molecular dynamics simulations. *PNAS*. 2012; 109(50): 20637-42. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218348109>
 23. Martins M, Santos B, Martins A, Viveiros M, Couto I, Cruz A, et al. An instrument-free method for the demonstration of efflux pump activity of bacteria. *In vivo*. 2006; 20(5): 657-64.
 24. Martins M., Viveiros M, Couto I, Costa SS, Pacheco T, Fanning S, et al. Identification of efflux pump mediated multidrug resistant bacteria by the ethidium bromide agar cartwheel method. *in vivo*. 2011; 25(2): 171-8.
 25. Liu YH, Kuo SC, Lee YT, Chang IC, Yang SP, Chen TL, Fung CP. Amino acid substitutions of quinolone resistance determining regions in GyrA and ParC associated with quinolone resistance in *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter genomic species 13TU*. *J Microbiol Immunol Infect*. 2012; 45: 108–12. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2011.09.001>
 26. Lin L, Ling BD, Li XZ. Distribution of the multidrug efflux pump genes, *adeABC*, *adeDE* and *adeIJK*, and class 1 integron genes in multiple-antimicrobial-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*-*Acinetobacter calcoaceticus* complex. *Int J Antimicrob Agents*. 2009; 33: 27–32.
 27. Jassim KA, Ghaima KK, Saadedin SMK. *AdeABC* Efflux pump genes in multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. *Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection*. 2016; 3(4).
 28. JaponiNejad AR, Sofian M, Ghaznavi-Rad E. Molecular detection of *AdeABC* efflux pump genes in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and their contribution in imipenem resistance. *ISMJ*. 2014; 17(5): 815-23.
 29. Gholami M, Hashemi A, Hakemi-Vala M, Goudarzi H, Hallajzadeh M. Efflux pump inhibitor phenylalanine-arginine B-naphthylamide effect on the minimum inhibitory concentration of imipenem in *Acinetobacter baumannii* strains isolated from hospitalized patients in Shahid Motahari burn hospital, Tehran, Iran. *Jundishapur journal of microbiology*. 2015; 8(10).
 30. Kor S-B, Beatrice-Sing-Yieng Tou C-K, Chieng L, Michele-Sook-Yuin Hiew C-H. Distribution of the multidrug efflux pump genes *adeA*, *adeI*, *adeJ*, *adeY* and integrons in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from Malaysian hospitals. 2014.
 31. Lin L, Ling B-D, Li X-Z. Distribution of the multidrug efflux pump genes, *adeABC*, *adeDE* and *adeIJK*, and class 1 integron genes in multiple-antimicrobial-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*-*Acinetobacter calcoaceticus* complex. *Int J Antimicrob Agents*. 2009; 33(1):27- 32.