

# Application of multiplex-PCR in *oxa* and *ndm* genes assessment and definition of antibiotic resistance pattern in *Acinetobacter baumannii* clinical samples

Atena Salman Hormati, Reza Yari\*, Mohsen Mirzaee

Department of Biology, Medicinal Plants, Health and Food Security Research Center, Borujerd Branch, Islamic Azad University, Borujerd, Iran

## Abstract

**Aim and Background:** *Acinetobacter baumannii* is the cause of a wide range of nosocomial infections. Antibiotic resistance of this organism is a major challenge worldwide. The aim of this study was to identify *oxa* and *ndm* genes by multiplex-PCR and to determine the pattern of antibiotic resistance.

**Material and Methods:** This study was performed in a period of 8 months by collecting 25 bacterial plate isolates. Antibiotic susceptibility testing was performed on Müller Hinton agar medium by disk diffusion method. MPprimer software was used to design the primers. After data collection, the level of significance was assessed at  $P < 0.05$  using SPSS 22.

**Results:** Except for gentamicin, cefpime, ciprofloxacin and tobramycin, there is a significant relationship between resistance pattern and sensitivity. All *A. baumannii* isolates were sensitive to ceftazidime. Also, 20% of the isolates were resistant to imipenem, which are considered carbapenem-resistant isolates of *A. baumannii*. Of the 25 isolates studied, 5 isolates (20%) had *oxa58* gene, 5 isolates (20%) had *oxa23* gene and three isolates (12%) had *ndm* gene.

**Conclusion:** The high prevalence of antibiotic resistance genes in *A. baumannii* isolates emphasizes the need for a systematic program in the control and treatment of this pathogen and shows necessity for more attention from health centers in prescribing appropriate antibiotics. Multiplex PCR method is a sensitive and reliable method for rapid detection of resistance genes in *A. baumannii* isolates.

**Keywords:** *Acinetobacter baumannii*, Antibiotic resistance, Multiplex-PCR, Iau Science.

### Corresponding author:

Department of Biology, Medicinal Plants, Health and Food Security Research Center, Borujerd Branch, Islamic Azad University, Borujerd, Iran

**Email:** rezayari@yahoo.com

# کاربرد مولتی پلکس PCR در شناسایی ژن های *ndm* و *oxa* و تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در نمونه‌های بالینی *اسینتوباکتر بومانی*

آتنا سلمان حرمتی، رضا یاری\*، محسن میرزایی

گروه زیست شناسی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی سلامت و امنیت غذایی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران

## چکیده

**سابقه و هدف:** *اسینتوباکتر بومانی* عامل طیف وسیعی از عفونت‌های بیمارستانی می‌باشد. مقاومت آنتی‌بیوتیکی این ارگانیزم چالشی مهم در سراسر جهان است. هدف این مطالعه شناسایی ژن‌های *ndm* و *oxa* با روش Multiplex-PCR و تعیین الگوی مقاومت دارویی می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** مطالعه در بازه زمانی ۸ ماهه با جمع آوری ۲۵ ایزوله باکتریایی در پلیت انجام شد. حساسیت آنتی‌بیوتیکی بر روی محیط مولر هینتون آگار به روش انتشار از دیسک انجام گردید. جهت طراحی پرایمرها از نرم افزار MPprimer استفاده شد. سطح معنی داری با در نظر گرفتن  $P < 0.05$  با استفاده از SPSS 22 بررسی شد.

**یافته‌ها:** به جز جنتامایسین، سفپیم، سیپروفلوکساسین و توبرامایسین، ارتباط معنی داری بین الگوی مقاومتی و حساسیتی وجود دارد. همه ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی* به سفتازیدیم حساس بودند. همچنین ۲۰٪ ایزوله‌ها به ایمی‌پنم مقاوم بودند که به عنوان ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی* مقاوم به کاربپنم در نظر گرفته می‌شوند. از ۲۵ ایزوله تحت مطالعه تعداد ۵ ایزوله (۲۰٪) دارای ژن *oxa58*، ۵ ایزوله (۲۰٪) دارای ژن *oxa23* و سه ایزوله (۱۲٪) دارای ژن *ndm* بودند.

**نتیجه‌گیری:** شیوع بالای ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی* نیاز به برنامه مدون در کنترل و درمان این پاتوژن را تأکید کرده و لزوم توجه بیشتر مراکز بهداشتی را در تجویز آنتی‌بیوتیک مناسب نشان می‌دهد. روش مولتی پلکس PCR روشی حساس و قابل اعتماد در تشخیص سریع ژن‌های مقاومت در ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی* است.

**واژگان کلیدی:** *اسینتوباکتر بومانی*، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، مولتی پلکس PCR، Iau Science.

## مقدمه

*اسینتوباکتر نوزوکومیالیس* سه گونه غالب کلینیکی بوده که در اکثر مواقع با عفونت‌های بیمارستانی در ارتباط هستند ولی *اسینتوباکتر کالکواستیکوس* یک گونه محیطی می‌باشد که از آب و خاک جدا شده و هرگز در ارتباط با بیماری‌های کلینیکی جدی نبوده است (۳). *اسینتوباکترها* کوکوباسیل‌های گرم منفی، کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی، غیرمتحرک و به اندازه ۱-۱/۵ در ۱/۵-۲/۵ میکرومتر می‌باشند. این باکتری‌ها در همه جای محیط و هم چنین محیط بیمارستان‌ها نظیر ونتیلاتورها، مرطوب کننده‌ها، کاتترها و سایر تجهیزات پزشکی حضور دارند (۴-۱). *اسینتوباکترها* بر روی اکثر محیط‌های آزمایشگاهی از قبیل بلادآگار، تریپتیک سوی آگار و مک کانگی آگار در دمای ۳۷ درجه سلسیوس رشد می‌نمایند. این باکتری‌ها قادر به تخمیر لاکتوز نیستند ولی برخی از آن‌ها بر روی محیط مک کانگی آگار تولید رنگ ارغوانی یا صورتی ضعیف می‌کنند که این امر سبب می‌شود تا آن‌ها را به اشتباه به عنوان

*اسینتوباکتر (Acinetobacter)* در اوایل قرن بیستم توسط میکروبیولوژیست هلندی به نام Beijerinck تحت عنوان ارگانیزمی به نام میکروکوکوس کالکواستیکوس (*Micrococcus calcoaceticus*) جدا شده از خاک معرفی شد (۱،۲). چهار گونه *اسینتوباکتر* شامل *اسینتوباکتر کالکواستیکوس*، *اسینتوباکتر بومانی (Acinetobacter baumannii)*، *اسینتوباکتر پیتی* و *اسینتوباکتر نوزوکومیالیس* وابستگی زیادی باهم داشته و به سختی می‌توان آن‌ها را از طریق ویژگی‌های فنوتیپی تمایز داد. با این وجود *اسینتوباکتر بومانی*، *اسینتوباکتر پیتی* و

نویسنده مسئول:

گروه زیست شناسی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی سلامت و امنیت غذایی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران  
پست الکترونیکی: rezayari@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۵/۰۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۱۹

یک باکتری تخمیرکننده لاکتوز گزارش نمایند (۵).  
 اسینتوباکتر بومانی قادر به تجزیه قندهای گوناگون نظیر گلوکز، لاکتوز، مانوز، گزیلوز، رامنوز و آرابینوز و در نتیجه تولید اسید است، چندین مکانیسم برای تولید مقاومت اسینتوباکتر بومانی نسبت به کاربپنم‌ها ارائه شده است که می‌توان به تولید کاربپنماز شبه اکساسیلیناز، کاهش نفوذپذیری غشای خارجی توسط کاهش یا حذف بیان پورین‌های 29 KDa و 33 KDa و تغییرات در پروتئین متصل شونده به پنی سیلین اشاره کرد (۶). از مهم‌ترین پتانسیل بیماری‌زایی اسینتوباکتر بومانی وجود ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ژنوم آن‌ها می‌باشد. ژنوم اسینتوباکتر بومانی سویه AYE حاوی یک جزیره بیماری‌زایی الحاقی موسوم به AbaR1 می‌باشد که ۴۵ عدد از کل ۵۲ ژن‌های مقاومت دارویی را شامل می‌شود (۷). اما عواملی که در بیماری‌زایی اسینتوباکترها موثر هستند شامل پروتئین OmpA، LPS، پیلی، فسفولیپاز، سیستم‌های ترشحی، وزیکول‌های غشا خارجی تشکیل بیوفیلیم و سیستم کسب آهن با واسطه اسینتوباکتین هستند که نقش‌های آن‌ها به طور خلاصه نظیر القا آپوپتوزیس در سلول‌های میزبان، فرار از پاسخ ایمنی میزبان، رشد و نمو در سرم، فراهم نمودن آهن مورد نیاز برای بقا باکتری می‌باشند (۸،۹). بتالاکتامازها که دفاع اصلی باکتری‌های گرم منفی علیه آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام هستند از خانواده آنزیم‌های هیدرولیتیک می‌باشند که با هیدرولیز آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی باعث تبدیل آن‌ها به مشتقات بدون فعالیت ضدباکتریایی می‌شوند. این آنزیم‌ها با شکستن حلقه بتالاکتام در پنی سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها موجب غیرفعال شدن آن‌ها و محافظت باکتری از اثرات مخرب این داروها در طی پروسه درمان می‌شود (۱۰). *oxa-23* به همراه *oxa-58* و *oxa-24* در گروه D بتالاکتامازهای هیدرولیز کننده کاربپنم‌ها قرار می‌گیرند. ژن *oxa-23* اولین بار از کشور ترکیه و سپس از کشور هند گزارش شد. باکتری‌های حاوی این آنزیم‌ها باعث مقاومت به سفالوسپورین‌ها و کاربپنم‌ها می‌شوند. از میان ژن‌های کد کننده مقاومت به کاربپنم، ژن *oxa-23* شایع‌تر بوده و از طریق انتقال افقی کسب می‌شود. این ژن امروزه در ایزوله‌های اسینتوباکتر بومانی از سراسر جهان گزارش می‌گردد. در ایران فراوانی *oxa-23* از ۷/۵۵٪ تا ۱۰۰٪ گزارش شده است. این آنزیم دارای فعالیت بسیار زیاد هیدرولیتیکی علیه اگزاسیلین و کلوگزاسیلین بوده به طور ضعیف توسط

کلاولانیک اسید مهار می‌شوند و در باکتری‌ها سهم بسیار قابل توجهی را در مقاومت به کاربپنم‌ها به عهده دارند (۱۱). اگزاسیلیناز *oxa-58* کاربپنمازهایی که در گروه D بتالاکتاماز قرار دارند، به‌عنوان اگزاسیلیناز-β lactamase Type-oxa نیز نامیده می‌شوند، این آنزیم‌ها فعالیت هیدرولیز کنندگی‌شان بر روی کاربپنم‌ها، کمتر از متالو بتالاکتاماز (MBLs) می‌باشد ولی در صورتی که این گروه از ژن‌های *oxa*، در مجاورت توالی‌های الحاقی که به Insertion sequence (IS) معروفاند قرار گیرند، تحت تأثیر پرموتری قوی آن‌ها می‌توانند بیان خود را افزایش دهند. مهم‌ترین گروه‌های آنزیمی در این خانواده شامل گروه آنزیمی *oxa-58* که ژن آن بر روی کروموزوم اصلی باکتری قرار دارد. انتقال افقی ژن‌ها توسط عناصر ژنتیکی متحرکی از قبیل پلاسمیدها، ترانسپوزون‌ها، اینتگرون‌ها و فایزها صورت می‌گیرد و دلیل انتشار سریع مقاومت پادزیستی در بین باکتری‌ها به خاطر حضور این ژن‌های فرعی می‌باشد (۱۲). متالوبتالاکتاماز دهلی نو *ndm-1* آنزیمی است که باعث مقاومت باکتری‌ها در برابر طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام می‌شود. این موارد شامل آنتی‌بیوتیک‌های خانواده کاربپنم است که پایه اصلی درمان عفونت‌های باکتریایی مقاوم به آنتی‌بیوتیک هستند. ژن *ndm-1* یکی از اعضای یک خانواده ژنی بزرگ است که آنزیم‌های بتالاکتاماز را به نام کاربپنماز کد می‌کند. باکتری‌های تولید کننده کاربپنمازها اغلب در رسانه‌های خبری با عنوان "فوق باکتری" شناخته می‌شوند زیرا درمان عفونت‌های ناشی از آنها دشوار است. این نوع باکتری‌ها معمولاً تنها به پلی میکسین‌ها و تیگی سایسکلین حساس هستند. *ndm-1* اولین بار در ایزوله کلبسیلا پنومونیه (*Klebsiella pneumoniae*) از یک بیمار سوئدی با اصالت هندی در سال ۲۰۰۸ شناسایی شد. تشخیص ژن *ndm-1* به تعیین فنوتیپی فعالیت آنزیم بستگی دارد. این آنزیم‌ها به عنصر روی وابسته هستند و بنابراین به آنها متالو-بتا-لاکتاماز گفته می‌شود. مطالعات انجام شده وابستگی آن‌ها به روی و توانایی مواد شیمیایی شلاته کننده روی مانند EDTA در کاهش فعالیت آنها را نشان می‌دهد. مولتی پلکس PCR نوعی PCR است که دو یا چند توالی هدف را با افزودن بیش از یک جفت پرایمر و در یک مخلوط آزمایش، تکثیر می‌کند. با هدف بررسی چندین توالی در یک آزمایش همزمان می‌توان تمام فرآیندهای انجام گرفته در چندین تست را در یک آزمون خلاصه کرد. این تکنیک

51 انجام شد (۱۴). از محیط‌های کشت BHB و بلاد آگار جهت رشد باکتری اسینتوباکتر و استخراج DNA آن استفاده شد. همچنین برای تعیین الگوی مقاومت دارویی از روش انتشار دیسک بر روی محیط مولر هینتون آگار استفاده شد. دیسک‌های آنتی بیوگرام جنتامایسین، سفپیم، آمپی سیلین، سفنازیدیم، سفوکسیتین، سفتریاکسون، سیپروفلوکسازین، توبرامایسین، ایمی پنم و تتراسایکلین از شرکت پادتن طب در بسته‌های استریل خریداری شد. در کلیه مراحل آنتی بیوگرام و تحقیقات مولکولی از سویه استاندارد/اسینتوباکتر بومانی PTCC 1855 استفاده شد.

### ب) استخراج و تعیین کیفیت و کمیت DNA استخراجی

به منظور استخراج ژنوم باکتری جدایه‌های اسینتوباکتر بومانی از دو کشت ۲۴ ساعته در محیط BHB و بلاد آگار استفاده گردید. طی دو روز متوالی و دو دوره ۱۸-۲۴ ساعته در دمای ۳۷ درجه سلسیوس بر روی محیط BHB و سپس بلاد آگار رشد باکتری به حداکثر رسید. سپس با استفاده از روش جوشاندن و طبق دستورالعمل مراحل استخراج DNA انجام شد. سپس کیفیت و کمیت DNA استخراج شده بر اساس بررسی همزمان دو شاخص غلظت DNA استخراج شده (بر حسب میزان میکروگرم DNA در یک میلی لیتر) با کمک ژل الکتروفورز و نیز طیف سنجی (OD 260/280) بررسی شد (۱۵).

### ج) انجام PCR و ژل الکتروفورز

پرایمرها و برنامه دمایی/زمانی PCR جهت شناسایی ژن های *ndm* و *oxa* در نمونه‌های مورد بررسی براساس داده‌های جداول ۱ و ۲ بهینه‌سازی شدند.

نخستین بار در سال ۱۹۸۸ و به عنوان روشی برای تشخیص جهش‌های حذفی در ژن دیستروفین مورد استفاده قرار گرفت. حضور بیش از یک جفت پرایمر در تکنیک مولتی پلکس PCR باعث می‌شود که احتمال تشکیل پیوند هیدروژنی بین پرایمرها (در نتیجه تشکیل هتروداایمرهای پرایمر) و یا بین پرایمرها و محصولات PCR افزایش یابد. این امر احتمال خطا و تشکیل محصولات زاید را افزایش داده و در نتیجه بازده تکثیر برخی از قطعات و یا همه آن‌ها را کاهش می‌دهد. این اتفاقات می‌توانند باعث هدررفت قابل توجه سرمایه و زمان شوند. در نتیجه سنتز پرایمرها در مولتی پلکس PCR باید بهینه‌سازی شود. هدف از مطالعه حاضر بررسی و شناسایی ژن های *ndm* و *oxa* با روش مولتی پلکس PCR و تعیین الگوی مقاومت دارویی ایزوله‌های اسینتوباکتر بومانی جدا شده از نمونه‌های بالینی می‌باشد که در نمونه‌های شهرستان بروجرد با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام گردید.

## مواد و روش‌ها

### الف) جمع آوری و کشت نمونه‌ها

تعداد ۲۵ نمونه بالینی در پلیت تهیه گردید و در حداقل زمان به آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد منتقل گردید. این نمونه‌ها از بخش ICU بیمارستان‌های سطح شهرستان بروجرد جمع آوری شده بود. در کلیه مراحل پژوهش حقوق بیماران و کلیه پروتکل‌های بین المللی اخلاقی با وجود استفاده از ایزوله‌های موجود در پلیت رعایت گردید. تعداد نمونه‌ها با استفاده از فرمول کوکران برای جمعیت فوق محاسبه گردید (۱۳). تست‌های بیوشیمیایی جهت تعیین هویت اسینتوباکترها به صورت کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی و نیز آزمون PCR ژن *oxa*-

جدول ۱. ژن های هدف و پرایمرهای به کار رفته در مطالعه به همراه اندازه امپلیکون های حاصل از PCR

| نام ژن        | توالی نوکلئوتیدی (۵'→۳')                    | طول قطعه<br>امپلیکون<br>(bp) |
|---------------|---|------------------------------|
| <i>oxa-23</i> | AGTATTGGGGCTTGTGCT<br>AACTTCCGTGCCTATTTG    | ۴۵۳                          |
| <i>oxa-58</i> | ATGCAGCAACGAAGTGAAT<br>CCCCAGCCACTTTTAGCATA | ۲۳۳                          |
| <i>ndm-1</i>  | GCGCAACACAGCCTGACTTT<br>CAGCCACCAAAGCGATGTC | ۱۰۰۰                         |

جهت مشاهده DNA استخراج شده و مشاهده محصول تولیدشده از تکثیر ژن های مورد نظر امپلیکون از الکتروفورز با ژل آگارز ۰/۷٪ و ۱/۵٪ با کمک رنگ DNA Safe Stain و در حضور DNA مارکر ۱۰۰۰-۱۰۰ bp شرکت DENAzist استفاده شد (Cat No. S-5090).

واکنش مولتی پلکس PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر و در ۳۵ چرخه دمایی/زمانی طبق جدول ۲ در واکنش حاوی ۱mM MgCl<sub>2</sub>، ۱X بافر PCR، ۲ U آنزیم Taq، یک پیکومول برای هر پرایمر، ۲۰۰ μM مولکول dNTPs و ۲ μl از DNA الگو انجام شد.

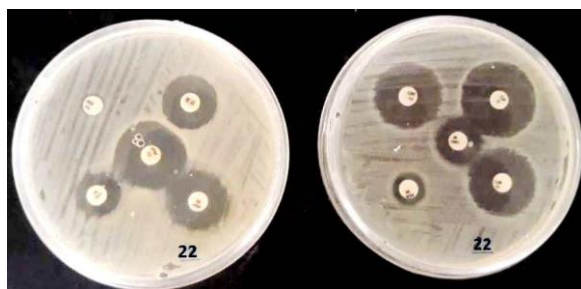
جدول ۲. برنامه دمایی/زمانی واکنش مولتی پلکس PCR جهت بررسی ژن های *oxa* و *ndm*

| مرحله            | دما  | زمان     |
|------------------|------|----------|
| واسرشتگی اولیه   | ۹۵°C | ۳ دقیقه  |
| واسرشتگی در چرخه | ۹۵°C | ۳۰ ثانیه |
| اتصال            | ۵۸°C | ۳۰ ثانیه |
| گسترش            | ۷۲°C | ۴۵ ثانیه |
| گسترش نهایی      | ۷۲°C | ۵ دقیقه  |

## یافته‌ها

جنتاماسین، سفپیم، سیپروفلوکساسین و توبراماسین، ارتباط معنی داری بین الگوی مقاومتی و حساسیتی وجود دارد (P-value>0.05). همچنین نتایج نشان داد که همه ایزوله های/اسینتوباکتر بومانی ۱۰۰٪ به سفتازیدیم حساس بودند (P-value=0.00). در ادامه ۲۰٪ از سویه‌ها به ایمی پنم مقاوم بودند که به عنوان ایزوله های/اسینتوباکتر بومانی مقاوم به کاربایم ها در نظر گرفته می‌شوند.

۲۵ نمونه بالینی موجود در پلیت در مطالعه حاضر مورد بررسی قرار گرفتند که قبلاً از بیمارستان های سطح شهر بروجرد جمع‌آوری شده بودند. نتایج حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله‌ها که بر روی محیط مولر هینتون آگار و بر اساس معیارهای تفسیر CLSI سال ۲۰۲۰ به دست آمد که آنالیز آماری با استفاده از برنامه SPSS نسخه ۲۲ انجام گردید. سطح معنی داری P<0.05 در نظر گرفته شد. بررسی معنی داری نتایج طبق جدول ۳ نشان داد که به جز



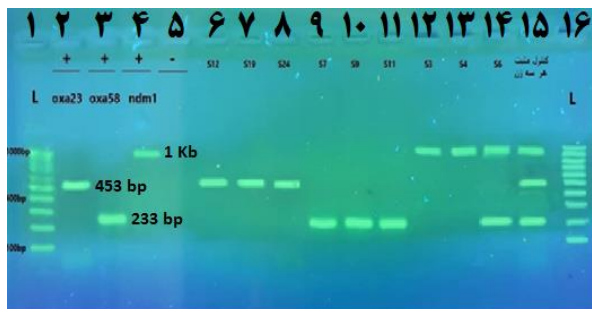
شکل ۱. تعیین قطر هاله عدم رشد در آزمون کربی-بائر ایزوله شماره ۲۲

جدول ۳. پروفایل آنتی بیوگرام ایزوله‌های تحت مطالعه و معنی داری مقاومت در سطح  $P < 0.05$

| نام آنتی بیوتیک    | تعداد (درصد) الگوی مقاومتی ایزوله‌ها |           |          | P-value |
|--------------------|--------------------------------------|-----------|----------|---------|
|                    | حساس                                 | نیمه حساس | مقاوم    |         |
| GM(Gentamicin)     | ۱۴ (%۵۶)                             | ۲ (%۸)    | ۹ (%۳۶)  | ۰/۰۶    |
| FEP(Cefepime)      | ۸ (%۳۲)                              | ۵ (%۲۰)   | ۱۲ (%۴۸) | ۰/۰۷    |
| AM(Ampicillin)     | ۱۶ (%۶۴)                             | ۱ (%۴)    | ۸ (%۳۲)  | *۰/۰۱   |
| CAZ(Ceftazidime)   | ۲۵ (%۱۰۰)                            | ۰ (%۰)    | ۰ (%۰)   | *۰/۰۰   |
| FOX(Cefoxitin)     | ۱۳ (%۵۲)                             | ۶ (%۲۴)   | ۶ (%۲۴)  | *۰/۰۳   |
| CRO(Ceftriaxone)   | ۶ (%۲۴)                              | ۲ (%۸)    | ۱۷ (%۶۸) | *۰/۰۲   |
| CIP(Ciprofloxacin) | ۹ (%۳۶)                              | ۲ (%۸)    | ۱۴ (%۵۶) | ۰/۰۶    |
| TOB(Tobramycin)    | ۱۱ (%۴۴)                             | ۳ (%۱۲)   | ۱۱ (%۴۴) | ۰/۰۸    |
| IMP(Imipenem)      | ۲۰ (%۸۰)                             | ۰ (%۰)    | ۵ (%۲۰)  | *۰/۰۲   |
| TET(Tetracycline)  | ۸ (%۳۲)                              | ۴ (%۱۶)   | ۱۳ (%۵۲) | *۰/۰۱   |

\* به معنی  $P < 0.05$  و معنی داری مقاومت و یا حساسیت به آنتی بیوتیک مورد نظر می‌باشد. طی واکنش PCR محصولات واکنش با اندازه‌های ۲۳۳ bp، ۴۵۳ bp، ۱۰۰۰ در برخی نمونه‌ها مطابق شکل (۱) مشاهده گردید. جهت تعیین اندازه قطعات تکثیری از نشانگر مولکولی ۱۰۰ bp در چاهک‌های یک و ۱۶ استفاده شد (ستون‌های L). چاهک‌های (+) و (-) بیانگر کنترل‌های منفی و مثبت می‌باشند. در کنترل منفی از واکنش فاقد DNA و در کنترل‌های مثبت از DNA حاوی ژن مورد نظر استفاده شده است. چاهک‌های ۶، ۷ و ۸ ایزوله‌های دارای تنها ژن *oxa-23*، چاهک‌های ۹، ۱۰ و ۱۱ ایزوله‌های دارای تنها ژن *oxa-58* و چاهک‌های ۱۲ و ۱۳ ایزوله‌های دارای تنها ژن *ndm-1* می‌باشند. در چاهک ۱۴ ایزوله شماره ۶ وجود دارد که دارای هر دو ژن *oxa-58* و *ndm-1* می‌باشد. هیچ ایزوله‌ای که همزمان دارای هر سه ژن مورد نظر ما باشد در واکنش مولتی پلکس-PCR مشاهده نشد. چاهک شماره ۱۵ کنترل مثبت هر سه ژن مورد مطالعه می‌باشد (شکل ۲).

۹۲



شکل ۲. ژل الکتروفورز ۱/۵٪ آگارز امپلیکون های حاصل از تکثیر ژن های *oxa-23*، *oxa-58* و *ndm-1*

## بحث

در دهه گذشته در خارج از کشور مطالعات مختلفی بر روی این ژن‌ها انجام شده است اما با توجه به ضرورت بررسی این ژن‌ها در ایران، اقدام به بررسی آن در نمونه‌های موجود در پلیت که قبلاً از بیماران بستری در بخش‌های ICU بیمارستان‌های شهرستان بروجرد جداسازی شده گردید. درمان عفونت‌های ناشی از این ارگانیزم دشوار است زیرا باکتری مقاومت ذاتی به عوامل ضد میکروبی و آنتی بیوتیک‌های موثر نشان می‌دهد. این مقاومت ذاتی به عوامل ضد میکروبی و مقاومت‌های چندگانه به دارو (MDR) که در نتایج مشاهده شد یک مشکل مهم و یک معضل بزرگ در درمان عفونت *اسینتوباکتر بومانی* به شمار می‌رود که سبب وخیم‌تر شدن وضعیت درمان عفونت‌های *اسینتوباکتر بومانی* در مراکز درمانی می‌گردد، بیماران مبتلا به این آسیب‌ها در معرض خطر عفونت‌های بیمارستانی هستند، زیرا زخم‌های سوختگی محل استقرار باکتری‌های فرصت طلب از جمله سودوموناس آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) و *اسینتوباکتر بومانی* می‌باشند. عوامل زیادی از جمله آنزیم‌ها، آگزو توکسین‌ها، سیدروفور و پروتئین‌های غشای خارجی در بیماریزایی این باکتری نقش دارند. از عوامل بیماریزایی مهم در این باکتری، وجود پروتئین‌های غشای خارجی مانند *OmpA* و پروتئین‌های دخیل در جذب آهن مانند *BauA* و *BasD* است (۱۳).

## نتیجه گیری

در دهه گذشته در خارج از کشور مطالعات مختلفی بر روی این ژن‌ها انجام شده است اما با توجه به ضرورت بررسی این ژن‌ها در ایران، اقدام به بررسی آن در نمونه‌های موجود در پلیت که قبلاً از بیماران بستری در بخش‌های ICU بیمارستان‌های شهرستان بروجرد جداسازی شده گردید. درمان عفونت‌های ناشی از این ارگانیزم دشوار است زیرا باکتری مقاومت ذاتی به عوامل ضد میکروبی و آنتی بیوتیک‌های موثر نشان می‌دهد. این مقاومت ذاتی به عوامل ضد میکروبی و مقاومت‌های چندگانه به دارو (MDR) که در نتایج مشاهده شد یک مشکل مهم و یک معضل بزرگ در درمان عفونت *اسینتوباکتر بومانی* به شمار می‌رود که سبب وخیم‌تر شدن وضعیت درمان عفونت‌های *اسینتوباکتر بومانی* در مراکز درمانی می‌گردد، بیماران مبتلا به این آسیب‌ها در معرض خطر عفونت‌های بیمارستانی هستند، زیرا زخم‌های سوختگی محل استقرار باکتری‌های فرصت طلب از جمله سودوموناس آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) و *اسینتوباکتر بومانی* می‌باشند. عوامل زیادی از جمله آنزیم‌ها، آگزو توکسین‌ها، سیدروفور و پروتئین‌های غشای خارجی در بیماریزایی این باکتری نقش دارند. از عوامل بیماریزایی مهم در این باکتری، وجود پروتئین‌های غشای خارجی مانند *OmpA* و پروتئین‌های دخیل در جذب آهن مانند *BauA* و *BasD* است (۱۳).

در سال ۲۰۱۰ مشخص گردید که ژن *oxa-23* یکی از شایع‌ترین ژن‌های رمزگذاری شده کارباپنم‌ها است که در سرتاسر جهان گزارش شده است و می‌تواند بر روی کروموزوم یا پلاسمید قرار بگیرد (۱۸). در مطالعه‌ای که توسط Manachanda در سال ۲۰۱۰ صورت گرفت مشخص شد که کارباپنم‌های کلاس D (OXA) یکی از مهمترین بتا لاکتامازهای طبیعی در *اسینتوباکتر* است که علت اصلی مقاومت به کارباپنم در این میکروارگانیزم می‌باشد. این ژن‌ها در مناطقی مانند اسکاتلند، اسپانیا، فرانسه، ژاپن، سنگاپور، چین، برزیل و کوبا مشخص شده‌اند. چهار گروه از آنزیم‌های هیدرولیز کارباپنم کلاس D مثل *oxa-*

23 و *oxa-24* و ژن های مشابه *oxa-51* و *oxa-58* در اسینتوباکتر شناسایی شده است (۱۹). در مطالعه Kooti و همکاران در سال ۲۰۱۵ شیوع کم ژن *oxa-58* در بین ایزوله های مقاوم در برابر کارباپنم مشخص شد. در این مطالعه شیوع ژن *oxa-58* را در شیراز (۰/۵٪)، در تهران (۳/۳٪) و در تبریز (۳/۲٪) اعلام شد (۲۰). در مطالعه Rezaei و همکاران در سال ۲۰۱۸ شیوع ژن های *oxa* در بیمارستان های ۳ منطقه اصفهان اعداد متفاوتی را نشان داد، همه ایزوله های دارای *oxa-51* و فاقد *oxa-58* بوده و بیشترین فراوانی مربوط به ژن *oxa-23* در ایزوله‌های مقاوم به کرباپنم بود (۲۱). اختلافات مشاهده شده در مطالعات فوق با مطالعه پیشرو می‌تواند در نتیجه فاصله جغرافیایی، سال انجام مطالعه، منشا نمونه برداری و حجم نمونه باشد. همچنین تنوع ژنتیکی ایزوله‌ها در توانایی کسب فاکتورهای مقاومتی خارجی از قبیل کاست های ژنی، اینتگرون و پلاسمید می‌تواند در الگوی منطقه‌ای آنتی بیوگرام تاثیرگذار باشد. به هر حال در توجیه این اختلافات علاوه بر موارد پیش گفته باید بر این نکته نیز اضافه نمود که نتایج حاصل از بررسی‌های اپیدمیولوژی در خصوص مقاومت آنتی بیوتیکی عوامل باکتریایی، همواره قابل پیش بینی نیست. همچنین امید است که این یافته‌ها پزشکان را به اینکه آنتی بیوتیک‌ها را با احتیاط بیشتری تجویز و اثرات آن را پایش کنند، تشویق کند تا بتوان این مشکل را کنترل کرد.

## تضاد منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند در تحقیق حاضر هیچ گونه تضاد منافع وجود ندارد.

## سپاسگزاری

نویسندگان از مسوولان آزمایشگاه تحقیقاتی بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه آزاد واحد بروجرد کمال تشکر را ابراز می‌دارند.



## منابع

1. Lin MF, Lan CY. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: from bench to bedside. *World J Clin Cases*. 2014; 2(12):787-814.
2. Rossau R, Van Landschoot A, Gillis M, de Ley J. 1991. Taxonomy of Moraxellaceae fam. A new bacterial family to accommodate the genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and related organisms. *Int J System Bacteriol*. 1991; 41(2):310-319.
3. Safari M, Saidijam M, Bahador A, Jafari R, Alikhani MY. High prevalence of multidrug resistance and metallo-beta-lactamase (MbetaL) producing *Acinetobacter baumannii* isolated from patients in ICU wards, Hamadan, Iran. *J Res Health Sci*. 2013; 13(2):162-7.
4. Chuang YC, Sheng WH, Li SY, Lin YC, Wang JT, Chen YC et al. Influence of genospecies of *Acinetobacter baumannii* complex on clinical outcomes of patients with *Acinetobacter* bacteremia. *Clin Infect Dis*. 2011; 52(3):352-360.
5. Zhang WJ, Lu Z, Schwarz S, Zhang RM, Wang XM, Si W et al. Complete sequence of the bla(NDM-1)-carrying plasmid pNDM-AB from *Acinetobacter baumannii* of food animal origin. *J Antimicrob Chemother*. 2013; 68(7):1681-1682.
6. Kyriakidis I, Vasileiou E, Pana ZD, Tragiannidis A. *Acinetobacter baumannii* antibiotic resistance mechanisms. *Pathogens*. 2021; 10(3):373-404.
7. Godeux AS, Svedholm E, Lupo A, Haenni M, Venner S, Laaberki MH, Charpentier X. Scarless removal of large resistance island AbaR results in antibiotic susceptibility and increased natural transformability in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020. 21;64(10):1-20.
8. Lucidi M, Visaggio D, Migliaccio A, Capecchi G, Visca P, Imperi F, Zarrilli R. Pathogenicity and virulence of *Acinetobacter baumannii*: Factors contributing to the fitness in healthcare settings and the infected host. *Virulence*. 2024; 15(1):1-28.
9. Yao Y, Chen Q, Zhou H. Virulence Factors and Pathogenicity Mechanisms of *Acinetobacter baumannii* in Respiratory Infectious Diseases. *Antibiotics*. 2023; 12(12):1-21.
10. Ayoub Moubareck C, Hammoudi Halat D. Insights into *Acinetobacter baumannii*: A Review of Microbiological, Virulence, and Resistance Traits in a Threatening Nosocomial Pathogen. *Antibiotics (Basel)*. 2020. 12;9(3):119-148.
11. Evans BA, Amyes SG. OXA  $\beta$ -lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2014; 27(2):241-63.
12. Verma V, Testero SA, Amini K, Wei W, Liu J, Balachandran N, Monoharan T, Stynes S, Kotra LP, Golemi-Kotra D. Hydrolytic mechanism of OXA-58 enzyme, a carbapenem-hydrolyzing class D  $\beta$ -lactamase from *Acinetobacter baumannii*. *J Biol Chem*. 2011; 286(43):37292-37303.
13. Cochran WG. *Sampling Techniques*, 3<sup>rd</sup> Ed., New York, John Wiley and Sons, Inc. 1977, 442 pages.
14. Falah F, Shokoohzadeh L, Adabi M. Molecular identification and genotyping of *Acinetobacter baumannii* isolated from burn patients by PCR and ERIC-PCR. *Scars Burn. Heal*. 2019;5:1-7.
15. Lucena-Aguilar G, Sánchez-López AM, Barberán-Aceituno C, Carrillo-Ávila JA, López-Guerrero JA, Aguilar-Quesada R. DNA source selection for downstream applications based on DNA quality indicators analysis. *Biopreserv Biobank*. 2016; 14(4):264-270.
16. Babaei AH, Pouladfar G, Pourabbas B, Jafarpour Z, Ektesabi S, Abbasi P. Seven-year trend of antimicrobial resistance of *Acinetobacter* and *Pseudomonas* spp. causing bloodstream infections: A retrospective study from Shiraz, Southern Iran. *Jundishapur J Microbiol*. 2019; 30;12(4):1-8.
17. Poorabbas B, Mardaneh J, Rezaei Z, Kalani M, Pouladfar G, Soltani J, Shamsi-Zadeh A, Abdoli-Oskooi S, Saffar MJ, Alborzi A. Nosocomial Infections: Multicenter surveillance of antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* and gram negative rods isolated from blood and other sterile body fluids in Iran. *Iran J microbiol*. 2015;7(3):127-135.
18. Mognier JC, Tsai PJ, Lee YC, Chen YC. Affinity capture of uropathogenic *Escherichia coli* using pigeon ovalbumin-bound magnetic nanoparticles. *Anal Chem*. 2008; 80(14):5425-5432.
19. Manachanda PH, Chen YC. 2010. Human serum albumin stabilized gold nanoclusters as selective luminescent probes for *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Anal Chem*. 2012; 84:8952-8956.
20. Kooti S, Motamedifar M, Sarvari J. Antibiotic resistance profile and distribution of oxacillinase genes among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* in Shiraz teaching hospitals, 2012-2013. *Jundishapur J Microbiol*. 2015; 8(8):1-6.

21. Rezaei A, Fazeli H, Moghadampour M, Halaji M, Faghri J. Determination of antibiotic resistance pattern and prevalence of OXA-type carbapenemases among *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from inpatients in Isfahan, central Iran. Infez. Med. 2018; 26(1):61-66.