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 *oxa* و *ndm* 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 ارگانیسم چالشی مهم در سراسر جهان است. هدف این مطالعه شناسایی ژن‌های *oxa* و *ndm* 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 آنتی بیوتیکی 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 درنظر 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 اسینتوباکتربومانی به سفتازیدیم حساس بودند. همچنین ۲۰٪ ایزوله ها به ایمی‌پنم مقاوم بودند که به عنوان ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی* مقاوم به کارباپنم 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 ایزوله های *اسینتوباکتر بومانی* نیاز به برنامه مدون در کنترل و درمان این پاتوژن را تأکید کرده و لزوم توجه بیشتر مراکز بهداشتی را در تجویز آنتی بیوتیک مناسب نشان می‌دهد. روش مولتی پلکس PCR روشی حساس و قابل اعتماد در تشخیص سریع ژن های مقاومت در ایزوله های *اسینتوباکتر بومانی* است.

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

مقدمه

اسینتوباکتر (Acenitobacter) در اوایل قرن بیستم توسط میکروبیولوژیست هلندی به نام Beijerinck تحت عنوان ارگانیسمی 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 *اسینتوباکتر نوزوکومیالیس* سه گونه غالب کلینیکی بوده که در اکثر مواقع با عفونت‌های بیمارستانی در ارتباط هستند ولی *اسینتوباکتر کالکواستیکوس* یک گونه محیطی می باشد 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 می-باشند. 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 می-کنند که این امر سبب می‌شود تا آن‌ها را به اشتباه به عنوان

نویسنده مسئول:
گروه زیست شناسی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی سلامت و امنیت غذایی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران
پست الکترونیکی: rezayari@yaho.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 کاربانپم ها ارائه شده است که می‌توان به تولید کاربانماز شبه اکساسیلیناز، کاهش نفوذپذیری غشای خارجی توسط کاهش یا حذف بیان پورین های 29 KDa و 33 KDa و تغییرات در پروتئین متصل شونده به پنی سیلین اشاره کرد (۶). از مهم‌ترین پتانسیل بیمای‌زایی *اسینتوباکتر بومانی* وجود ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ژنوم آن‌ها می‌باشد. ژنوم *اسینتوباکتر بومانی* سویه AYE حاوی یک جزیره بیماری زایی الحاقی موسوم به AbaR1 می باشد که ۴۵ عدد از کل ۵۲ ژن های مقاومت دارویی را شامل می‌شود (۷). اما عواملی که در بیماری زایی اسینتوباکتر ها موثر هستند شامل پروتئین OmpA، LPS، پیلی، فسفولیپاز، سیستم-های ترشحی، وزیکول های غشا خارجی تشکیل بیوفیلم 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 می باشند (۸،۹). بتالاکتامازها که دفاع اصلی باکتری های گرم منفی علیه آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام هستند از خانواده آنزیم های هیدرولیتیک می‌باشند که با هیدرولیز آنتی بیوتیک‌های 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 کاربانپم ها قرار می‌گیرند. ژن *oxa-23* اولین بار از کشور ترکیه و سپس از کشور هند گزارش شد. باکتری‌های حاوی این آنزیم‌ها باعث مقاومت به سفالسپورین‌ها و کاربانپم‌ها می‌شوند. از میان ژن‌های کد کننده مقاومت به کاربانپم، ژن *oxa-23* شایع‌تر بوده و از طریق انتقال افقی کسب می‌شود. این ژن امروزه در ایزوله های *اسینتوباکتر بومانی* از سراسر جهان گزارش می‌گردد. در ایران فراوانی *oxa-23* از ۵۵/۷٪ 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 کاربانپم‌ها به عهده دارند(۱۱). اگزاسیلیناز *oxa-58* کاربانپمازهایی که در گروه D بتالاکتاماز قرار دارند، به‌عنوان اگزاسیلیناز lactamase–β– Type-oxa نیز نامیده می‌شوند، این آنزیم‌ها فعالیت هیدرولیز کنندگی‌شان بر روی کاربانپم‌ها، کمتر از متالو بتالاکتاماز (MBLs) می‌باشد ولی درصورتی‌که این گروه از ژن‌های *oxa*، در مجاورت توالی‌های الحاقی که به Insertion sequence (IS) معروف‌اند قرار گیرند، تحت تأثیر پروموتری 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، ترانسپوزون ها، اینتگرون ها و فاژها 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 باکتری ها در برابر طیف وسیعی از آنتی بیوتیک های بتا لاکتام می شود. این موارد شامل آنتی بیوتیک‌های خانواده کاربانپم است که پایه اصلی درمان عفونت‌های باکتریایی مقاوم به آنتی بیوتیک هستند. ژن *ndm-1* یکی از اعضای یک خانواده ژنی بزرگ است که آنزیم‌های بتا لاکتاماز را به نام کاربانپماز کد می‌کند. باکتری‌های تولید کننده کاربانپمازها 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 می توان تمام فرآیندهای انجام گرفته در چندین تست را در یک آزمون خلاصه کرد. این تکنیک

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 می شود که احتمال تشکیل پیوند هیدروژنی بین پرایمرها (در نتیجه تشکیل هترودایمرهای 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 آن ها را کاهش می‌دهد. این اتفاقات می‌توانند باعث هدررفت قابل توجه سرمایه و زمان شوند. در نتیجه سنتز پرایمرها در مولتی پلکس PCR باید بهینه سازی شود. هدف از مطالعه حاضر بررسی و شناسایی ژن های *oxa* و *ndm* با روش مولتی پلکس PCR و تعیین الگوی مقاومت دارویی ایزوله های *اسینتوباکتر بومانی* جدا شده از نمونه های بالینی می باشد که در نمونه های شهرستان بروجرد با استفاده از پرایمر های 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 بیمارستان های 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-51* انجام شد (۱۴). از محیط های 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، سفتازیدیم، سفوکسیتین، سفتریاکسون، سیپروفلوکسازین، توبرامایسین، ایمی پنم و تتراسایکیلین از شرکت پادتن طب در بسته های 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 وکمیت DNA استخراجی

به منظور استخراج ژنوم باکتری جدایه های *اسینتوباکتر بومانی* از دو کشت ۲۴ ساعته در محیط BHB و بلاد آگار استفاده گردید. طی دو روز متوالی و دو دوره ۲۴-۱۸ 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

پرایمر ها و برنامه دمایی/زمانی PCR جهت شناسایی ژن های *oxa* و *ndm* در نمونه های مورد بررسی براساس داده های جداول ۱ و ۲ بهینه سازی شدند.

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 امپلیکون (bp)
oxa-23	AGTATTGGGGCTTGTGCT AACTTCCGTGCCTATTTG	۴۵۳
oxa-58	ATGCAGCAACGAAGTGAAT CCCCAGCCACTTTTAGCATA	۲۳۳
ndm-1	GCGCAACACAGCCTGACTTT CAGCCACCAAAAGCGATGTC	۱۰۰۰

واکنش مولتی پلکس PCR در حجم ۲۵ ماکرولیتر و در ۳۵ چرخه دمایی/زمایی طبق جدول ۲ در واکنش حاوی MgCl2 ۱mM، بافر PCR ۱X، ۲ U آنزیم Taq، یک پیکومول برای هر پرایمر، ۲۰۰ µM مولکول dNTPs و ۲ µl از DNA الگو انجام شد.

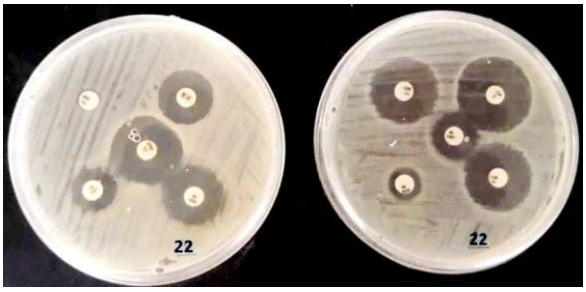
جهت مشاهده DNA استخراج شده و مشاهده محصول تولیدشده از تکثیر ژن های مورد نظر امپلیکون از الکتروفورز با ژل آگارز ۰/۷٪ و ۱/۵٪ با کمک رنگ DNA Safe Stain و در حضور DNA مارکر bp ۱۰۰۰-۱۰۰شرکت DENAzist استفاده شد (Cat No. S-5090).

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

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

یافته‌ها

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 جنتاماسیسن، سفپیم، سیپروفلوکساسین و توبرامایسین، 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 کارباپنم ها در نظر گرفته می‌شوند.

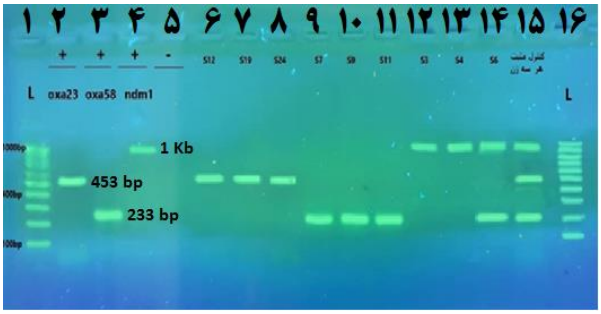


شکل ۱. تعیین قطر هاله عدم رشد در آزمون کربی-بائر ایزوله شماره ۲۲

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

نام آنتی بیوتیک	تعداد (درصد) الگوی مقاومتی ایزوله ها			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(Cefoxitn)	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 اندازه های ۲۳۳ bp، ۴۵۳ bp، ۱۰۰۰ bp در برخی نمونه‌ها مطابق شکل (۱) مشاهده گردید. جهت تعیین اندازه قطعات تکثیری از نشانگر مولکولی ۱۰۰bp در چاهکهای یک و ۱۶ استفاده شد (ستون های L). چاهک های (+) و (-) بیانگر کنترل های 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* می باشند. 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).



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 نمونه های موجود در پلیت که قبلاً از بیماران بستری در بخش های ICU بیمارستان های شهرستان بروجرد جداسازی شده گردید. درمان عفونت‌های ناشی از این ارگانیسم دشوار است زیرا باکتری مقاومت ذاتی به عوامل ضد میکروبی و آنتی بیوتیک های موثر نشان می‌دهد. این مقاومت ذاتی به عوامل ضد میکروبی و مقاومت های چندگانه به دارو (MDR) که در نتایج مشاهده شد یک مشکل مهم و یک معضل بزرگ در درمان عفونت *اسینتوباکتر بومانی* به شمار می رود که سبب وخیم‌تر شدن وضعیت درمان عفونت های *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 آنزیم ها، اگزو توکسین ها، سیدروفور و پروتئین های غشای خارجی در بیماریزایی این باکتری نقش دارند. از عوامل بیماریزایی مهم در این باکتری، وجود پروتئین های غشای خارجی مانند OmpA و پروتئین های دخیل در جذب آهن مانند BauA وBasD است (۱۳).

نتیجه‌گیری

در مطالعه ای که Babaei و همکاران در سال ۱۳۹۶ در شیراز انجام دادند نشان داد که از ۴۷۳ سویه *اسینتوباکتر بومانی*، اکثر ایزوله ها به خانواده سفالوسپورین ها (سفتیم، سفوتاکسیم، سفتازیدیم، سفتریاکسون) مقاوم بودند و مقاومت و حساسیت به خانواده های مختلف آنتی بیوتیکی می تواند تحت تاثیر سالیان مختلف (سه دوره از ۲۰۱۰ تا ۲۰۱۶)، حجم نمونه و یا منشا نمونه گیری نتایج متفاوتی داشته باشد (۱۶). همچنین در مطالعه Poorabbas و همکاران که در سال ۱۳۹۳ انجام شد دریافتند که بیشترین مقاومت به آنتی بیوتیک های آمیکاسین(۶۵٪) و سفوتاکسیم(۶۲٪) و کمترین مقاومت به آنتی بیوتیک های پیپراسیلین (۴۸٪) و ایمی پنم (۵۵٪) مقاومت مشاهده شد. این نتایج با مطالعه حاضر تقریباً همخوانی دارد اما اختلاف اساسی در نتایج مقاومت به ایمی پنم که یک کارباپنم است می باشد. در مطالعه حاضر ۲۰٪ ایزوله های *اسینتوباکتر بومانی* مقاوم به ایمی پنم بودند و به عنوان *اسینتوباکتر بومانی* مقاوم به کارباپنم شناخته شدند. از مهم ترین دلایل این اختلاف می توان به اختلاف در منطقه جغرافیایی و اختلاف در سال مطالعه و منشا نمونه گیری را نام برد (۱۷). به منظور بررسی وجود ژن های مقاومتی شامل *oxa23*، *oxa58* و *ndm-1* در ایزوله‌های بالینی تحت مطالعه از روش مولتی پلکس PCR استفاده شد. نتایج نشان داد که از ۲۵ ایزوله تحت مطالعه تعداد ۵ ایزوله (۲۰٪) دارای ژن *oxa58*، ۵ ایزوله (۲۰٪) دارای ژن *oxa23* و ۳ ایزوله نیز (۱۲٪) دارای ژن *ndm-1* بودند.

همسو با مطالعه حاضر، در مطالعه Mognier و همکاران در سال ۲۰۱۰ مشخص گردید که ژن *oxa-23* یکی از شایع ترین ژن های رمزگذاری شده کارباپنم ها است که در سرتاسر جهان گزارش شده است و می تواند بر روی کروموزوم یا پلاسمید قرار بگیرد(۱۸). در مطالعه ای که توسط Manachanda در سال ۲۰۱۰ صورت گرفت مشخص شد که کارباپنم های کلاس D (OXA) یکی از مهمترین بتا لاکتامازهای طبیعی در اسینتوباکتر است که علت اصلی مقاومت به کارباپنم در این میکروارگانیسم می باشد. این ژن ها در مناطقی مانند اسکاتلند، اسپانیا، فرانسه، ژاپن، سنگاپور، چین، برزیل و کوبا مشخص شده اند. چهار گروه از آنزیم های هیدرولیز کرباپنم 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٪) 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 هرحال 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 بیوتیک ها را با احتیاط بیشتری تجویز و اثرات آن را پایش کنند، تشویق کند تا یتوان این مشکل را کنترل کرد.

تضاد منافع

نویسندگان اعلام می دارند 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 می دارند.

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 β-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 β-lactamase from Acinetobacter baumannii. J Biol Chem. 2011; 286(43):37292-37303.
13. Cochran WG. Sampling Techniques, 3rd Ed., New York, John Wiley and Sons, Inc. 1977, 442 pages.
14. Falah F, Shokoohizadeh 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.