مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره سی و دو، شماره شش، شهریور ۱۴۰۳
تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۰۲
تاریخ پذیرش:۱۴۰۳/۰۳/۰۹

بررسی فراوانی ژن‌های منتخب دخیل در تشکیل بیوفیلم در جدایه‌های بالینی اسینتوباکتر بومانی

رضا نصرتی‌پور[۱]، محسن میرزایی*[۲]، محمدرضا مهرابی[۲]

مقاله پژوهشی

مقدمه: اسینتوباکتربومانی، کوکوباسیل گرم منفی غیرتخمیری است که مقاومت بالایی به ترکیبات ضد میکروبی نشان می‌دهد. تشکیل بیوفیلم یکی از ویژگی‌های مهم بسیاری از گونه‌های اسینتوباکتر است که منجر به مقاومت بالا به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود. مطالعه حاضر با هدف بررسی شیوع ژن‌های ompA، csuA، bap و pgaB در جدایه‌های بیمارستانی دارای توانایی تشکیل بیوفیلم اسینتوباکتر بومانی است.

روش بررسی: در این مطالعه مقطعی تعداد ۴۹ جدایه اسینتوباکتر بومانی از بیماران بستری در مراکز درمانی شهرستان بروجرد جمع‌آوری شد. جدایه‌های اسینتوباکتر بومانی با آزمون‌های بیوشیمیایی تأیید گردیدند. در این جدایه‌ها توانایی تولید بیوفیلم به روش میکروتیترپلیت بررسی شد. سپس با استفاده از روش PCR و پرایمرهای اختصاصی، ژن‌های ompA، csuA، bap و pgaB شناسایی شدند. داده‌های جمع آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS version 16 به‌طور توصیفی و تحلیلی بررسی شدند؛ تحلیل داده‌ها با آزمون مربع کای، آزمون دقیق فیشر انجام شد و P<0/05 به عنوان مبنای معنی‌دار بودن Significant در نظر گرفته شد

نتایج: ژن‌های ompA، csuA، bap و pgaB به ترتیب در ۸۷٪، ۹۲٪، ۹۸٪ و ۱۰۰٪ جدایه‌ها ردیابی شدند. هم‌چنین با استفاده از روش میکروتیترپلیت تشکیل بیوفیلم در ۳ جدایه (۶ درصد) قوی، در ۱۷ جدایه (۳۵ درصد) متوسط و در ۲۹ جدایه (۵۹ درصد) ضعیف گزارش گردید.

نتیجه‌گیری: با توجه به شیوع بالای ژن‌های دخیل در تشکیل بیوفیلم در جدایه‌های اسینتوباکتر بومانی، مورد بررسی. می‌توان گفت جدایه‌های مورد مطالعه، توانایی بالایی برای تشکیل ساختارهای بیوفیلم دارند.

واژه‌های کلیدی: اسینتوباکتر بومانی، ژن‌های بیوفیلم، عفونت بیمارستانی

ارجاع: نصرتی‌پور رضا، میرزایی محسن، مهرابی محمدرضا. **بررسی فراوانی ژن‌های منتخب دخیل در تشکیل بیوفیلم در جدایه‌های بالینی اسینتوباکتر بومانی**. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۴۰۳؛ ۳۲ (۶): ۳۲-۷۹۲۲.

۱-گروه زیست شناسی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران.
۲-گروه علوم آزمایشگاهی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران.
*(نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۹۱۶۶۶۵۸۹۳۷، پست الکترونیکی: mirzaei.iaub@gmail.com، صندوق پستی :۶۹۱۵۱۳۶۱۱۱

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-09-01]

[DOI: 10.18502/ssu.v32i6.16381]

مقدمه

اسینتوباکتر بومانی به دلیل پراکندگی آن در بیمارستان و انتقال به بیماران بستری، به‌طور عمده از نمونه‌های انسانی و محیط بیمارستان جدا می‌شود. این باکتری می‌تواند در بیماران بستری در بخش مراقبت ویژه (ICU) باعث عفونت‌هایی مانند پنومونی مرتبط با ونتیلاتور، باکتریمی، عفونت‌های ادراری و برخی دیگر از عفونت‌های بیمارستانی گردد (۲ ، ۱) و عامل بیش از ۱۰٪ عفونت‌های بیمارستانی و ۷۰٪ مرگ و میرهای ناشی از عفونت است (۳). پنومونی‌های ایجاد شده توسط اسینتوباکتر بومانی می‌تواند به‌صورت اکتسابی از جامعه بوده و یا در بیمارستان به دلیل ارتباط بیمار با دستگاه‌های تهویه یا اشیاء خارجی مانند لوله‌گذاری در تراشه، تراکئوستومی و یا سابقه جراحی و بیماری‌های ریوی قبلی به‌وجود می آید. طول مدت بستری بیماران مستعد در ICU و سهل‌انگاری در بهداشت احتمال کلونیزاسیون و عفونت ناشی از اسینتوباکتر بومانی را افزایش می‌دهد (۵،۴). به اجتماع سلول‌های میکروبی که محکم به سطحی اتصال پیدا می‌کنند با یک ماتریکس پلی‌ساکاریدی که دارای منشأ میکروبی است بیوفیلم می‌گویند. اصولاً باکتری‌ها با تشکیل بیوفیلم سبب مقاومت در برابر عوامل ضد میکروبی، مقاومت در برابر سیستم ایمنی میزبان و سبب حفظ شرایط فیزیکی و شیمیایی مناسب برای رشد می‌شوند و این امر سبب مقاومت بیوفیلم‌ها در شرایط نامساعد می‌شود. در ضمن روابط سینرژیسم و هم‌یاری بین باکتری‌های بیوفیلم در مقاومت آن‌ها در مقابل شرایط نامساعد مؤثراست (۷،۶). یکی از ویژگی‌های بارز بیوفیلم‌ها، تفاوت در الگوی رشد آن‌ها است که منجر به مقاومت دارویی و نیاز به روش‌های درمانی و شناسایی متفاوت می‌شود. بیوفیلم‌ها، مشابه اسپورهای باکتریایی، در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت نشان می‌دهند، به گونه‌ای که برخی محققان بر این باورند که مقاومت بیوفیلم‌ها در مقابل آنتی‌بیوتیک‌ها تا هزار برابر بیشتر از سلول‌های پلانکتونیک است. بیوفیلم‌ها در برابر عوامل ضدباکتریایی نظیر مواد ضدعفونی‌کننده، حرارت و خشک‌سازی مقاوم هستند و بر روی سطوح باقی می‌مانند، که این امر به‌ویژه در بیمارستان‌ها موجب آلودگی و انتقال بیماری‌های عفونی می‌شود و به‌صورت فیزیکی از باکتری‌ها در برابر سیستم ایمنی میزبان و آنتی‌بیوتیک‌ها محافظت می‌کند. این پدیده به عنوان یکی از دلایل عود بیماری‌های عفونی شناخته می‌شود (۸). پروتئین‌های مختلفی در ایجاد این مقاومت تأثیرگذارند که از این بین می‌توان به پروتئین‌های ایجادکننده و تقویت‌کننده ساختار بیوفیلم اشاره کرد. اولین عضو این گروه از پروتئین‌ها با عنوان *BAP* در باکتری اسینتوباکتربومانی شناسایی شده است. این پروتئین در سطح خارجی باکتری‌ها قرار دارند. شامل هسته مرکزی متشکل از تکرارهای متوالی از توالی‌های مشابه هستند. به باکتری قابلیت تشکیل بیوفیلم می‌دهند به این ترتیب نقش مهمی در عفونت‌زایی پاتوژن‌ها دارند (۹). اسینتوباکتر بومانی با بیان ژن *Bap* سبب کاهش نفوذپذیری و در نتیجه ایجاد مقاومت به کارباپنم‌ها می‌شود و علاوه بر آن با چسبندگی بالایی که با سطح زنده و غیرزنده ایجاد می‌نماید موجب پایداری بالای عامل بیماری‌زا می‌گردد (۱۰). غشای خارجی در باکتری‌های گرم منفی دارای ساختار دو لایه‌ای است که به نظر می‌رسد شبیه به غشای پلاسمایی باشد. در غشای خارجی، پروتئین‌ها در آن قرار می‌گیرند و سطح داخلی آن از فسفولیپیدها تشکیل شده است، که به شکلی مشابه با غشای سیتوپلاسمی ساخته شده‌اند. پروتئین‌های غشای خارجی، مانند OmpA، در باکتری‌های گرم منفی نقش‌های مهمی دارند. این پروتئین‌ها به نفوذپذیری سلولی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، تطابق با محیط و بیماری‌زایی در سلول میزبان کمک می‌کنند .در اسینتوباکتر بومانی نیز انواعی از پروتئین‌های غشاء خارجی از خانواده OmpA شناسایی شده‌اند (۱۱). این پروتئین فراوان‌ترین پروتئین سطحی باکتری است که در اتصال و تهاجم به سلول‌های اپی‌تلیال و القاء آپوپتوزیس در مراحل اولیه عفونت اسینتوباکتر بومانی نقش دارد (۱۲). علاوه بر این *OmpA* با مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ارتباط است. گرچه مطالعاتی دخالت *OmpA* را به عنوان عامل مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام نشان داده‌اند، اما هنوز نقش این پروتئین در مقاومت ضدمیکروبی به روشنی مشخص نشده است، از

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-09-01]

[DOI: 10.18502/ssu.v32i6.16381]

CC BY-NC 4.0

طرفی مقاومت این باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها در استفاده از داروها جهت درمان بیماران تأثیر نامطلوبی خواهد گذاشت (۱۳). توماراس نشان داد که شکل‌گیری بیوفیلم در اسینتوباکتر بومانی به‌طور فنوتیپی همراه با شکل‌گیری پیلوس و تولید اگزوپلی‌ساکارید بود. آنالیز بیشتر توالی‌ها مشخص کرد، اپرون پلی‌سیسترونیک *Csu* شامل ۵ ژن است که شبیه ژن‌هایی می‌باشد که پروتئین های مربوط به چاپرون و همچنین پروتئین‌هایی را که در تجمع پیلوس در دیگر باکتری‌های گرم منفی نقش دارد را کد می کند. چسبندگی اسینتوباکتر بومانی به سلول‌های اپیتلیال برونش انسان و گلبول‌های قرمز به علت وجود ساختاری شبه پیلوس ایجاد می‌شود (۱۴). هموپلیمر خطی پلی- بتا-۶،۱-N- استیل-D- گلوکز آمین (PGA:beta-1,6-GlcNAc) به عنوان ادهسین برای حفظ ساختار بیوفیلم در یوباکتری‌ها عمل می‌کند که عملکرد آن به محصولات ژنی اپرون *pgaABCD* نیاز دارد که همه آن‌ها برای تشکیل بیوفیلم ضروری هستند (۱۶، ۱۵). پژوهش در زمینه توانایی تشکیل بیوفیلم و ژن‌های مؤثر در این فرآیند در سویه‌های متفاوت اسینتوباکتر بومانی، می‌تواند داده‌های امیدبخشی را برای فهم بهتر فرایند پیچیده تشکیل بیوفیلم و عفونت‌های ناشی از این میکروارگانیسم‌ها ارائه دهد. بنابراین، مطالعه مورد نظر با هدف بررسی شیوع ژن‌های منتخب مرتبط با تشکیل بیوفیلم در نمونه‌های بالینی اسینتوباکتر بومانی صورت گرفته است.

روش بررسی

از ۴۹ نمونه (۱۳ قطره خون،۲۰ قطره خلط، ۱۲ قطره ادرار، ۴ نمونه زخم) اسینتوباکتر که از مراکز بهداشتی درمانی شهرستان بروجرد در پلیت جمع‌آوری شده بودند به آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد واحد بروجرد انتقال داده شد و مورد استفاده قرار گرفتند و شناسایی تأییدی باکتری با روش‌های استاندارد افتراقی میکروبیولوژی شد. به این ترتیب وجود کوکوباسیل‌های گرم منفی اسینتو باکتر به روش میکروسکوپی تأیید شد. سپس تست‌های افتراقی (MRVP)Methyl Red/ Voges-Proskaure و Sulfide Indol Motility (SIM) و Oxidative-Fermentative test(OF) و همچنین تست‌های کاتالاز و اکسیداز و سیمون سیترات نیز انجام شد. رشد در ۳۷ و ۴۲ درجه سلسیوس، نیز از جمله تست‌هایی بود که جهت تشخیص گونه‌های مختلف اسینتوباکتر انجام شد (۱۳) (شکل ۱).

تولید بیوفیلم

تولید بیوفیلم با استفاده از روش میکروپلیت: جدایه‌های اسینتوباکتر بومانی را در محیط TSB که با ۰/۵ درصد گلوکز غنی شده باشد کشت می‌دهیم و در انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت می‌گذاریم. محیط کشت حاوی سوسپانسیون میکروبی را به نسبت ۱ به ۵ رقیق شده سپس ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون برای اضافه شدن به چاهک‌های میکروپلیت انتخاب شد، در آن چاهک‌ها ریخته شده به مدت ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه انکوبه شد. کنترل منفی شامل ۲۰۰ میکرولیتر از محیط TSB بود (۱۵).

سنجش تولید بیوفیلم: بعد از انکوبه کردن به منظور سنجش مقدار تولید بیوفیلم در هر چاهک؛ ۱) در ابتدا میکروپلیت‌ها با استفاده از بافر PBS شستشو داده شدند، ۲) چاهک‌ها با استفاده از ۱۵۰ میکرولیتر متانول به مدت ۲۰ دقیقه ثابت می‌شوند سپس باقی مانده متانول خارج و پلیت در دمای اتاق در شرایط معکوس کاملاً خشک شده و ۳) به مدت ۱۵ دقیقه با رنگ سافرانین ۰/۰۱٪ رنگ‌آمیزی شد و سپس پلیت‌ها با آب مقطر شستشو داده شد و در مجاورت هوا خشک گردید و با اضافه کردن ۱۵۰ میکرولیتر اتانول ۹۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه رنگ متصل شده به باکتری در بیوفیلم تشکیل شده جدا می‌شود و جذب نوری را در طول موج ۴۹۰ nm با دستگاه الایزا ریدر اندازه‌گیری شد. مقادیر جذب نوری به عنوان شاخص اتصال باکتری‌ها به سطح و تشکیل بیوفیلم در نظر گرفته شد. برای تجزیه و تحلیل کمی تولید بیوفیلم، میانگین جذب نوری سه چاهک (A) محاسبه و با چاهک کنترل (AC) مقایسه و به‌صورت زیر محاسبه گردید:

۱- عدم تشکیل بیوفیلم: $A \leq Ac$

۲- تشکیل بیوفیلم به صورت ضعیف: $Ac \times \leq A < (2 \times Ac)$

۳- تشکیل بیوفیلم به صورت متوسط: $(2 \times Ac) \times \times < A \leq (4 \times Ac)$

۴- تشکیل بیوفیلم به صورت قوی: $A > (4 \times Ac)$

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-09-01]

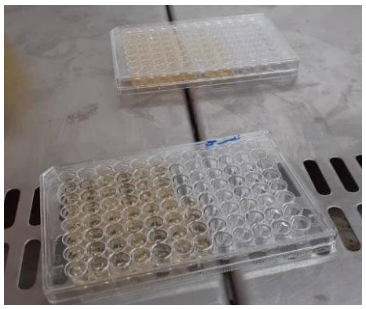
[DOI: 10.18502/ssu.v32i6.16381]

CC BY-NC 4.0

استخراج و تعیین کیفیت و کمیت DNA استخراجی: استخراج ژنوم به روش جوشاندن طبق دستورالعمل انجام شد. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده به ترتیب با کمک ژل الکتروفورز و نیز طیف سنجی (OD 260/280) بررسی شد (شکل۲).

روش PCR: واکنش PCR در حجم ۲۵ ماکرولیتر با استفاده از پرایمرهای اختصاصی جدول یک انجام شد. تکثیر ژن‌های منتخب با شرایط دمای واسرشت اولیه در ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل حرارتی شامل واسرشت در ۹۴°C به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمر مطابق جدول ۱ و تکثیر در ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه و در پایان تکثیر در ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. الکتروفورز محصولات PCR توسط ژل آگارز ۱٪ انجام و سپس باندها توسط دستگاه ژل داک (UVI-DOC) عکس‌برداری شد.

شکل ۱: اسینتوباکتر بومانی در Methyl Red/ Voges



شکل ۲: چاهک‌های بیوفیلم

جدول ۱: پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه (۱۸ و ۱۷).

ژن مورد نظر	توالی پرایمر (′۳→′۵)	طول قطعه (bp)	دمای اتصال (°C)
ompA	F:5'CGCTTCTGCTGGTGCTGAAT3′ R:5'CGTGCAGTAGCGTTAGGGTA3'	۵۳۱	۵۸
pgaB	F:5'AAGAAAATGCCTGTGCCGACCA3′ R:5'GCGAGACCTGCAAAGGGCTGATA3'	۴۹۰	۵۷
csuA	F:5'TGGTGAAGCTACCACAGGTT3′ R:5'ACGACTACCATCATGGGCTG3'	۳۲۲	۵۹
bap	F:5′:TGAAAGTGGCTGCCAGTGAT3′ R:5′TCTGCGTCAGCGTCACTATC3′	۲۲۳	۵۵

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-09-01]

[DOI: 10.18502/ssu.v32i6.16381]

CC BY-NC 4.0

تجزیه و تحلیل آماری

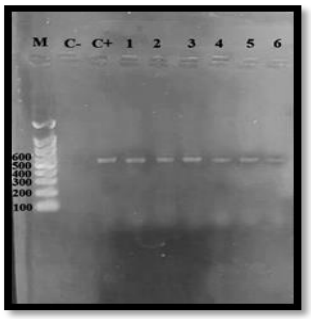
داده‌های جمع آوری شده با استفاده از نرم‌افزار version 16 SPSS به‌طور توصیفی و تحلیلی بررسی شدند؛ تحلیل داده‌ها با آزمون مربع کای، آزمون دقیق فیشر انجام شد و P<0/05 به عنوان مبنای معنی‌دار بودن Significant در نظر گرفته شد.

نتایج

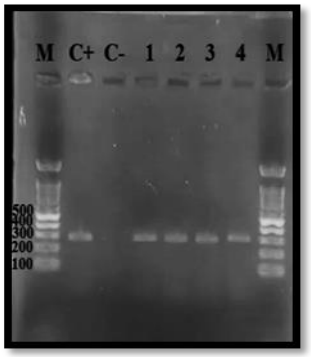
همه جدایه‌های مورد بررسی تمایل به تشکیل بیوفیلم داشتند. در میان انواع بیوفیلم تشکیل شده اکثر جدایه های مورد بررسی بیوفیلم ضعیف تشکیل دادند. فراوانی توانایی تشکیل بیوفیلم در میان جدایه‌های اسینتوباکتر بومانی در نمودار ۴-۱ گزارش شده است. تشکیل بیوفیلم در ۳ جدایه (۶ درصد) قوی، در ۱۷ جدایه (۳۵ درصد) متوسط و در ۲۹ جدایه (۵۹ درصد) ضعیف گزارش گردید. در این مطالعه مشخص شد، از میان ۴۹ جدایه اسینتوباکتر بومانی، ۴۳ جدایه (۸۷٪)، ۴۵ جدایه (۹۲٪)، ۴۸ جدایه (۹۸٪) و تمامی جدایه‌ها (۱۰۰٪) به ترتیب واجد ژن *ompA*، *csuA*، *bap* و *pgaB* بودند (اشکال ۳ تا ۶).

لازم به ذکر است کنترل مثبت با روش تعیین توالی‌یابی از حضور ژن مورد نظر تایید شد.

میزان تشکیل بیوفیلم در سویه‌های واجد ژن‌های *ompA*، *csuA*، *bap* و *pgaB* مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس آنالیز آماری بین میزان شدت تشکیل بیوفیلم به روش میکروتیترپلیت و حضور ژن‌های مورد مطالعه ارتباط معناداری مشاهده نشد (P≥0.05). ژن‌های *ompA*، *csuA*، *bap* و *pgaB* در جدایه‌های با توانایی تشکیل بیوفیلم (قوی، متوسط و ضعیف) مشاهده شدند.



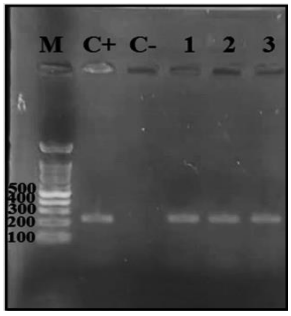
شکل ۳: محصولات PCR برای شناسایی ژن *ompA*: ستون M لدر ۱۰۰ جفت بازی، -C کنترل منفی، +C کنترل مثبت و ستون‌های ۱ تا ۶ نمونه‌های مثبت مورد آزمایش ۵۳۱ جفت بازی.



شکل ۴: محصولات PCR برای شناسایی ژن *csuA*: ستون M لدر ۱۰۰ جفت بازی، -C کنترل منفی، +C کنترل مثبت و ستون‌های ۱ تا ۴ نمونه‌های مثبت مورد آزمایش ۳۲۲ جفت بازی.

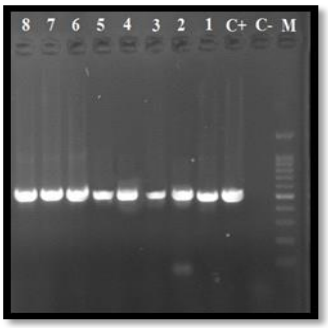
CC BY-NC 4.0

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-09-01]
[DOI: 10.18502/ssu.v32i6.16381]



شکل ۵: محصولات PCR برای شناسایی ژن *bap*

ستون M لدر ۱۰۰ جفت بازی، **C-** کنترل منفی، **C+** کنترل مثبت و ستون‌های ۱ تا ۳ نمونه‌های مثبت مورد آزمایش ۲۲۳ جفت بازی.



شکل ۶: محصولات PCR برای شناسایی ژن *pgaB*

ستون M لدر ۱۰۰ جفت بازی، C- کنترل منفی، C+ کنترل مثبت و ستون‌های ۱ تا ۸ نمونه‌های مثبت مورد آزمایش ۴۹۰ جفت بازی.

بحث

در طی دهه گذشته، اسینتوباکتر بومانی به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای بیمارستانی در سراسر جهان شناخته شده است. بخشی از این مسئله به توانایی بقای این میکروارگانیسم در محیط‌های بیمارستانی و اکتساب مکانیسم‌های مقاومتی و ایجاد عفونت‌های حاد، به‌ویژه در بیماران بدحال، مربوط می‌شود. با وجود اطلاعات فراوان در مورد مکانیسم‌های مسئول مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این میکروارگانیسم، هنوز راهی برای متوقف کردن آن معرفی نشده است (۱۹). شدت عفونت‌زایی اسینتوباکتر بومانی به‌طور مستقیم با فاکتورهای بیماری‌زایی آن مرتبط است. با این وجود، گزارش‌های مربوط به فراوانی فاکتورهای بیماری‌زایی در نمونه‌های کلینیکی اسینتوباکتر بومانی نسبتاً کم است (۲۰). در نتیجه چگونگی عفونت‌زایی و نیز پاسخ سیستم ایمنی میزبان نسبت به این عفونت‌ها، هم‌چنان در هاله‌ای از ابهام باقی مانده است. در این مطالعه، فراوانی چهار ژن مرتبط با فاکتورهای بیماری‌زایی در نمونه‌های بالینی *Acinetobacter baumannii* جدا شده از بیماران را بررسی کردیم. بیوفیلم به‌عنوان یک فاکتور بیماری‌زایی مهم در نمونه‌های بالینی اسینتوباکتر بومانی مطرح است. تشکیل بیوفیلم یکی از خصوصیت‌های مهم در پاتوژن‌زایی اسینتوباکتر به خصوص در عفونت‌های ایجاد شده به واسطه ونتیلاتور می‌باشد و این واضح است که افزایش تولید پلی‌ساکارید موجب افزایش بیوفیلم و متعاقب آن افزایش مقاومت می‌باشد. در مطالعه حاضر که به بررسی این موضوع پرداختیم و مشاهده شد تمامی جدایه‌ها توانایی تشکیل بیوفیلم را داشتند که با مطالعه Sechi و همکاران هم‌پوشانی نسبی دارد به‌طوری که ۸۰٪ سویه‌ها توانایی تشکیل بیوفیلم را داشتند (۲۱). در مطالعه حاضر تشکیل بیوفیلم در ۳ جدایه (۶ درصد) قوی، در ۱۷ جدایه (۳۵درصد) متوسط و در ۲۹ جدایه (۵۹ درصد) ضعیف گزارش گردید، در میان انواع بیوفیلم تشکیل شده اکثر جدایه های مورد بررسی بیوفیلم ضعیف تشکیل دادند که با مطالعه اکبری و

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-09-01]

[DOI: 10.18502/ssu.v32i6.16381]

CC BY-NC 4.0

همکاران هم‌خوانی دارد، هم‌چنین در مطالعه Nirwati و همکاران در سال ۲۰۱۸ (۲۲) که با هدف بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم در جدایه‌های اسینتوباکتر بومانی انجام شد نتایج نشان داد که ۵۲/۲٪ جدایه‌ها بیوفیلم ضعیف، ۲۰٪ جدایه‌ها بیوفیلم متوسط و ۲/۵٪ جدایه‌ها بیوفیلم قوی تشکیل دادند که با مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد. این در حالی است که در مطالعه مشابه رنجبر و همکاران تشکیل بیوفیلم در ۷۰/۶٪ قوی، در ۱۲/۲٪ متوسط و ۱۷/۲٪ ضعیف گزارش گردید اکثر جدایه‌های مورد بررسی بیوفیلم قوی تشکیل دادند (۲۳). گسترش و ضخامت ساختارهای بیوفیلم و اتصالات داخل سلولی ارتباط تنگاتنگ با پروتئین‌های خانواده *bap* دارد که توسط ژن *bap* کد می‌شوند (۲۴، ۲). نتایج حاصل از درصد فراوانی ژن‌های مطالعه حاضر با مطالعه Liu و همکاران که در چین انجام شد، شباهت زیادی دارد. در مطالعه مذکور بین ۸۸ نمونه بالینی اسینتوباکتر بومانی فراوانی ژن *bap* ۸۷/۵٪ گزارش گردید (۲۵). هم‌چنین در مطالعه Fallah و همکاران در سال ۲۰۱۷، روی ۱۰۰ ایزوله بالینی در ایران فراوانی این ژن ۹۲٪ گزارش شد (۲۶). *ompA* یک پروتئین غشای خارجی است که القاکننده بیوفیلم روی سلول‌های اپیتلیال انسانی است. این پروتئین توسط ژن *ompA* کد می‌شود (۲۷). در دو مطالعه جداگانه در ایران که توسط Bardbari و همکاران در سال ۲۰۱۷ و Zeighami و همکاران در سال ۲۰۱۹ انجام گردید، درصد فراوانی این ژن به ترتیب، ۱۰۰٪ در جدایه‌های بالینی اسینتوباکتر بومانی جدا شده از نمونه‌های تنفسی در مطالعه Bardbari و ۸۱٪ در جدایه‌های مربوط به سایر نمونه‌های بالینی در مطالعه و Zeighami و همکاران، گزارش شده است که شباهت بالایی با مطالعه حاضر داشتند (۲۸ ، ۱۷). اگرچه ژن *ompA*فراوانی بالایی دارد، ولی بر اساس مطالعات پیشین ایجاد ساختارهای بیوفیلم با ژن *bap* در مقایسه با ژن *ompA* ارتباط موثرتری دارد (۲۹). ژن *csuA* متعلق به اپرون ژنی csu است که شامل ۶ ژن (*csuA/BABCDE*) بوده و سیستم ترشحی چاپرون آشر را کد و در ایجاد پیلی و تشکیل ساختارهای بیوفیلم روی سطوح غیر جاندار بسیار مهم است (۳۰). در مطالعه حاضر ژن *csuA* فراوانی ۹۲٪ داشت. در مطالعه مظفری و همکاران که در سال ۲۰۱۸ بر روی نمونه‌های بالینی اسینتوباکتر بومانی انجام شد فراوانی این ژن ۹۸٪ گزارش شده است (۱۸). این یافته‌ها نشان دهنده این مهم هستند که بیشتر سویه‌های بالینی اسینتوباکتر بومانی جداشده، توانایی تشکیل بیوفیلم را دارند.در برخی مطالعات، شباهت داده‌ها با نتایج این تحقیق بسیار پایین بوده است، که این موضوع می‌تواند ناشی از تفاوت‌هایی در نوع نمونه‌های مورد بررسی و زمان انجام مطالعه باشد. به عنوان مثال، تغییرات جغرافیایی و تفاوت‌های فرهنگی در روش‌های نمونه‌برداری و تشخیص می‌تواند بر روی داده‌های به دست آمده تأثیر بگذارد. همچنین، تغییرات در شیوع بیماری‌ها و مقاومت دارویی در طول زمان می‌تواند بر نتایج تأثیر بگذارد. از سوی دیگر، باکتری‌های اسینتوباکتر بومانی از مکانیزم‌های متنوعی برای حفظ پاتوژنیسیته، فرار از سیستم ایمنی میزبان، و هم‌چنین مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده می‌کنند. این مکانیزم‌ها می‌توانند شامل تولید آنزیم‌هایی که آنتی‌بیوتیک‌ها را تجزیه می‌کنند، تغییر در ساختار گیرنده‌های دارویی، و استفاده از سیستم‌های افزار دفاعی مانند پمپ‌های افزار برای دفع دارو باشند. با وجود اینکه در کشور ما مطالعات فراوانی در رابطه با ویژگی‌های اپیدمیولوژیک و الگوی مقاومت دارویی جدایه‌های اسینتوباکتر بومانی انجام شده است، همچنان توجه به نقش این باکتری به عنوان یک عامل بالقوه خطرناک در عفونت‌های بیمارستانی ضروری به‌نظر می‌رسد. این امر به‌ویژه در محیط‌های بیمارستانی که با چالش‌های مقاومت دارویی مواجه هستند، اهمیت دارد. توسعه استراتژی‌های جدید برای مقابله با این باکتری‌ها و جلوگیری از شیوع بیماری‌های بیمارستانی ناشی از آن‌ها، یک اولویت بهداشتی مهم است. افزایش آگاهی در میان کادر پزشکی و بیماران، بهبود روش‌های کنترل عفونت، و تحقیقات بیشتر در زمینه مکانیزم‌های مقاومت دارویی این باکتری‌ها می‌تواند به کاهش خطرات ناشی از آن‌ها کمک کند.

نتیجه‌گیری

عفونت اسینتوباکتر بومانی، یک چالش پزشکی جهانی است. پاتوژن‌های فرصت‌طلب و به‌خصوص در تجمع و تداوم در محیط بیمارستان موفق هستند. قادر به مقاومت در برابر خشکی

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-09-01]

[DOI: 10.18502/ssu.v32i6.16381]

CC BY-NC 4.0

می‌باشند و در سطوح بی‌جان برای سال‌ها زنده می‌مانند. در میان شایع‌ترین علل عفونت بیمارستانی قرار دارد؛ به علت مقاومت در برابر عوامل فیزیکی و شیمیایی که با تشکیل بیوفیلم ایجاد می‌شود. کسب توانایی تشکیل بیوفیلم می‌تواند یک استراتژی خوب به منظور افزایش بقا تحت شرایط استرس، به عنوان مثال در طول حمله میزبان یا پس از درمان آنتی‌بیوتیک می‌باشد. درک بیش‌تری از ماهیت بیوفیلم و ارتباط بین سلولی در بیوفیلم و هم‌چنین نقش آن‌ها در ارتباط با مقاومت آنتی بیوتیکی و عفونت جدایه‌های اسینتوباکتر بومانی در توسعه درمان‌های جدید و موثر برای عفونت‌های اسینتوباکتر کمک خواهد کرد. با توجه به میزان فراوانی بالای ژن‌های دخیل در پاتوژنسیته، افزایش میزان شیوع بیمارستانی اسینتوباکتر بومانی، لزوم طراحی مطالعه در سطح وسیع و هم‌چنین برنامه‌های حفاظتی نظیر کنترل عفونت‌های ایجادشده در بخش مراقبت‌های ویژه را خاطرنشان می‌کند. هم‌چنین با استفاده از روش‌های مولکولی می‌توان این باکتری‌های پاتوژن را شناسایی و ویژگی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها را تعیین کرد و متناسب با آن آنتی‌بیوتیک‌ها تجویز نمود. محدود کردن استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها، گسترش و تغییر طرح‌های نظافت برای تجهیزات آلوده و دسته‌بندی بیمارانی که این باکتری در آن‌ها مستقر شده است، راهکار مفیدی برای کنترل انتشار این باکتری است.

سپاس‌گزاری

این مقاله برگرفته از رساله کارشناسی ارشد در رشته میکروبیولوژی در دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد می‌باشد. هزینه اجرای آن توسط پژوهشگر تامین شد. از تمامی آزمودنی‌ها و افرادی که در انجام این مطالعه شرکت و همکاری داشته‌اند تشکر و قدردانی می‌گردد.

حامی مالی: ندارد

تعارض در منافع : وجود ندارد.

ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این تحقیق توسط دانشگاه آزاد واحد بروجرد تایید شده است (کد اخلاق IR.IAU.B.REC.100.028)

مشارکت نویسندگان

محسن میرزایی در ارائه ایده، رضا نصرتی‌پور و محسن میرزایی در طراحی مطالعه، رضا نصرتی‌پور در جمع‌آوری داده‌ها، محمدرضا مهرابی در تجزیه و تحلیل داده‌ها مشارکت داشته و همه نویسندگان در تدوین، ویرایش اولیه و نهایی مقاله و پاسخگویی به سوالات مرتبط با مقاله سهیم هستند.

References:

1-Gedefie A, Demsis W, Ashagrie M, Kassa Y, Tesfaye M, Tilahun M, Bisetegn H, Sahle Z. ***Acinetobacter Baumannii Biofilm Formation and Its Role in Disease Pathogenesis: A Review***. Infect Drug Resist 2021; 14: 3711-19.

2-Longo F, Vuotto C, Donelli G. ***Biofilm Formation in Acinetobacter Baumannii***. New Microbiol 2014; 37(2): 119-27.

3-Zhu L, Yan Z, Zhang Z, Zhou Q, Zhou J, Wakeland EK, et al. ***Complete Genome Analysis of Three Acinetobacter Baumannii Clinical Isolates in China for Insight Into the Diversification of Drug Resistance Elements***. PLoS One 2013; 8(6): e66584.

4-Alamri AM, Alsultan AA, Ansari MA, Alnimr AM. ***Biofilm-Formation in Clonally Unrelated Multidrug-Resistant Acinetobacter Baumannii Isolates***. Pathogens 2020; 9(8): 630.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-09-01]

[DOI: 10.18502/ssu.v32i6.16381]

CC BY-NC 4.0

5-Gurung J, Khyriem AB, Banik A, Lyngdoh WV, Choudhury B, Bhattacharyya P**.** ***Association of Biofilm Production with Multidrug Resistance among Clinical Isolates of Acinetobacter Baumannii and Pseudomonas Aeruginosa from Intensive Care Unit.*** Indian J Crit Care Med 2013; 17(4): 214-8.

6-Lear G, Lewis GD. ***Microbial Biofilms: Current Research and Applications***. Horizon Sci Press; 2012.

7-Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. ***Bacterial Biofilms: From the Natural Environment to Infectious Diseases***. Nat Rev Microbiol 2004; 2(2): 95-108.

8-Stewart PS, Costerton JW. ***Antibiotic Resistance of Bacteria in Biofilms***. Lancet 2001; 358(9276): 135-8.

9-Brossard KA, Campagnari AA. ***The Acinetobacter Baumannii Biofilm Associated Protein Plays a Role in Adherence to Human Epithelial Cells***. Infect Immun 2012; 80: 228-33.

10- Jalali M, Rasooli I, Ahmadi Zanoos K, Jahangiri A, Jalali Nadooshan M, Darvish Alipour Astaneh S. ***Immunogenicity of Amino Acid Region 7601-8140 in Biofilm Associated Protein of Acinetobacter Baumannii***. MJMS 2014; 16(4): 15-26. [Persian]

11- McConnell MJ, Pachón J. ***Expression, Purification, and Refolding of Biologically Active Acinetobacter Baumannii Ompa from Escherichia Coli Inclusion Bodies***. Protein Expr Purif 2011; 77(1): 98-103.

12- Choi CH, Lee EY, Lee YC, Park TI, Kim HJ, Hyun SH, et al. ***Outer Membrane Protein 38 of Acinetobacter Baumannii Localizes to the Mitochondria and Induces Apoptosis of Epithelial Cells***. Cell Microbiol 2005; 7(8): 1127-38.

13-Smani Y, Fàbrega A, Roca I, Sánchez-Encinales V, Vila J, Pachón J. ***Role of Ompa in the Multidrug Resistance Phenotype of Acinetobacter Baumannii.*** Antimicrob Agents Chemother 2014; 58(3): 1806-8.

14-Tomaras AP, Dorsey CW, Edelmann RE, Actis LA. ***Attachment to and Biofilm Formation on Abiotic Surfaces by Acinetobacter Baumannii: Involvement of a Novel Chaperone-Usher Pili Assembly System***. Microbiology 2003; 149(pt12): 3473-84.

15-Wang X, Preston JF 3rd, Romeo T. ***The Pgaabcd Locus of Escherichia Coli Promotes the Synthesis of a Polysaccharide Adhesin Required for Biofilm Formation***. J Bacteriol 2004; 186(9): 2724-34.

16-Itoh Y, Rice JD, Goller C, Pannuri A, Taylor J, Meisner J, et al. ***Roles of Pgaabcd Genes in Synthesis, Modification, and Export of the Escherichia Coli Biofilm Adhesin Poly-B-1, 6-N-Acetyl-D-Glucosamine***. J Bacteriol 2008; 190(10): 3670-80.

17-Zeighami H, Valadkhani F, Shapouri R, Samadi E, Haghi F. ***Virulence Characteristics of Multidrug Resistant Biofilm Forming Acinetobacter Baumannii Isolated from Intensive Care Unit Patients***. BMC Infect Dis 2019; 19(1): 629. [Persian]

18-Mozafari H, Mirkalantari SH, Sadeghi Kalani B, Amirmozafari N. ***Prevalence Determination of Virulence Related and Biofilm Formation Genes in Acinetobacter Baumannii Isolates From Clinical Respiratory Samples in Imam Khomeini Hospital, Tehran, Iran in 2018***. Iran J Med Microbiol 2021; 15(3): 266-80. [Persian]

19-Tseng CC, Tsai YH, Hu A, Liou JW, Chang KC. ***Altered Susceptibility to the Bactericidal Effect of***

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-09-01]

[DOI: 10.18502/ssu.v32i6.16381]

CC BY-NC 4.0

Photocatalytic Oxidation. Appl Microbiol Biotechnol 2016; 100(19): 8549-61.

20-Morris FC, Dexter C, Kostoulias X, Uddin MI, Peleg A. ***The Mechanisms of Disease Caused By Acinetobacter Baumannii.*** Front Microbiol 2019; 10: 1601.

21-Sechi LA, Karadenizli A, Deriu A, Zanetti S, Kolayli F, Balikci E, et al. ***PER-1 Type Beta-Lactamase Production In Acinetobacter Baumannii Is Related To Cell Adhesion.*** Med Sci Monit Basic Res 2004; 10(6): BR180-BR4.

22-Nirwati H, Hakim MS, Darma S, Mustafa M, Nuryastuti T**.** ***Detection of Blaoxa Genes and Identification of Biofilm-Producing Capacity of Acinetobacter Baumannii in a Tertiary Teaching Hospital, Klaten, Indonesia.*** Med J Malaysia 2018; 73(5): 291-6.

23-Ranjbar R, Farahani A. ***Study of Genetic Diversity, Biofilm Formation, and Detection of Carbapenemase, MBL, ESBL, and Tetracycline Resistance Genes in Multidrug-Resistant Acinetobacter Baumannii Isolated from Burn Wound Infections in Iran***. Antimicrob Resist Infect Control 2019; 8(1): 172. [Persian]

24-Yang CH, Su PW, Moi SH, Chuang LY. ***Biofilm Formation in Acinetobacter Baumannii: Genotype-Phenotype Correlation***. Molecules 2019; 24(10): 1849.

25-Liu C, Chang Y, Xu Y, Luo Y, Wu L, Mei Z, et al. ***Distribution of Virulence-Associated Genes and Antimicrobial Susceptibility in Clinical Acinetobacter Baumannii Isolates***. Oncotarget 2018; 9(31): 21663-21673.

26-Fallah A, Rezaee MA, Hasani A, Barhaghi MHS, Kafil HS, et al. ***Frequency of Bap and Cpaa Virulence Genes in Drug Resistant Clinical Isolates of Acinetobacter Baumannii and their Role in Biofilm Formation***. Iran J Basic Med Sci 2017; 20(8): 849-55. [Persian]

27-Thummeepak R, Kongthai P, Leungtongkam U, Sitthisak S. ***Distribution of Virulence Genes Involved in Biofilm Formation in Multidrug Resistant Acinetobacter Baumannii Clinical Isolates***. Int Microbiol 2016; 19(2): 121-9.

28-Bardbari AM, Arabestani MR, Karami M, Keramat F, Alikhani MY, Bagheri KP. ***Correlation between Ability of Biofilm Formation with their Responsible Genes and MDR Patterns in Clinical and Environmental Acinetobacter Baumannii Isolates***. Microb Pathog 2017; 108: 122-8.

29-Lib SS, Abdulrahman TR, Ali SH. ***Detection of Some Biofilm Genes Related with Multidrug-Resistant in Acinetobacter Baumannii Isolated from Clinical Isolates***. Iraqi J Med Sci 2018; 16(4): 430-8.

30-McConnell MJ, Actis L, Pachón J. ***Acinetobacter Baumannii: Human Infections, Factors Contributing to Pathogenesis and Animal Models***. FEMS Microbiol Rev 2013; 37(2): 130-55.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-09-01]

[DOI: 10.18502/ssu.v32i6.16381]

CC BY-NC 4.0

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol 32| NO 6 | Aug 2024

Received: 21 Feb 2024
Accepted: 29 May 2024

Examining the Frequency of Selected Genes Involved in Biofilm Formation in Clinical Isolates of *Acinetobacter Baumannii*

Reza Nasratipour[1], Mohsen Mirzaei[†2], Mohammad Reza Mehrabi[2]

Original Article

Introduction: Acinetobacter baumannii, a non-fermenting Gram-negative coccobacillus, exhibits high resistance to antimicrobial compounds. Biofilm formation is a crucial feature in many Acinetobacter species, contributing to their antibiotic resistance. The present study aimed to investigate the prevalence of ompA, csuA, bap and pgaB genes in clinical isolates of Acinetobacter baumannii with biofilm formation ability.

Methods: In this cross-sectional study, 49 isolates of Acinetobacter baumannii were collected from patients hospitalized in the health centers of Borujerd City. Acinetobacter baumannii isolates were confirmed by biochemical tests. In these isolates, the biofilm production ability was investigated by microtitreplate method. Then, using PCR method and specific primers, ompA, csuA, bap and pgaB genes were identified.The collected data were analyzed descriptively and analytically using SPSS version 16 software. Data analysis was done with Chi-square test, Fisher's exact test, and $P<0.05$ was considered as the basis of significance.

Results: The presence of ompA, csuA, bap, and pgaB genes was detected in 87%, 92%, 98%, and 100% of the isolates, respectively. Additionally, the microtitreplate method revealed that biofilm formation was strong in 3 isolates (6%), moderate in 17 isolates (35%), and weak in 29 isolates (59%).

Conclusion: The prevalence of genes associated with biofilm formation in Acinetobacter baumannii isolates was high. This suggests that the studied isolates possess a significant ability to form biofilm structures.

Keywords: Acinetobacter baumannii, Biofilm genes, Hospital infection.

Citation: Nasratipour R, Mirzaei M, Mehrabi MR. **Examining the Frequency of Selected Genes Involved in Biofilm Formation in Clinical Isolates of Acinetobacter Baumannii.** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2024; 32(6): 7922-32.

[1]Department of Biology, Borujard Branch, Islamic Azad University, Borujard, Iran.

[2]Department of Laboratory Sciences, Borujard Branch, Islamic Azad University, Borujard, Iran.

***Corresponding author: Tel:** 09166658937**, email:** mirzaei.iaub@gmail.com

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-09-01]

[DOI: 10.18502/ssu.v32i6.16381]

CC BY-NC 4.0