

# Phenotypic Investigation of Biofilm Formation and Determination of Presence of *bap* and *bla<sub>OXA-51</sub>* Genes in *Acinetobacter baumannii* From Clinical Specimens in Tehran

Vahid Rouhi<sup>1</sup>, Roya Safarkar<sup>1\*</sup>, Sanaz Habibi<sup>2</sup>

1. Department of biology, Islamic Azad University, Ardabil Branch, Ardabil, Iran
2. Department of biology, Islamic Azad University, Guilan Branch, Guilan, Iran

doi [10.30699/ijmm.14.6.566](https://doi.org/10.30699/ijmm.14.6.566)



## ABSTRACT

**Background:** *Acinetobacter baumannii* is a non-fermentative gram-negative coccobacill that has high level of resistance to antimicrobial agents. Biofilm formation is an important feature of most clinical isolates of *Acinetobacter spp*, this led to higher resistance to antibiotics. The current study aimed to assess the ability of biofilm production and to determine the frequency of *bap* gene in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*.

**Materials & Methods:** This descriptive cross-sectional study was performed on 165 strains collected from hospitals of Tehran in 2019 and confirmatory tests were performed to identify the bacteria. The antibiotic resistance pattern of the isolates was determined by disk diffusion method against 10 antibiotics and also the ability of biofilm production was evaluated by microtiter plate method (MPT) and tube method (TM). Subsequently Molecular assays of *bla<sub>OXA-51</sub>* and *bap* genes identification and its frequency were investigated.

**Results:** In this study, among 165 isolates examined, 73 isolates were confirmed as *A. baumannii*. Among 73 strains studied the most antibiotic resistance was imipenem (94.52%). *bla<sub>OXA-51</sub>* and *bap* genes were detected in 100% and 53.42% of isolates. Also, 8 isolates (10.95%) by MTP and 7 isolates (9.58%) by the TM method were able to form strong biofilm.

**Conclusion:** The results obtained showed that in consistent with other researches, biofilm formation in *A. baumannii* isolates was associated with present of *bap* gene.

**Keywords:** *Acinetobacter baumannii*, biofilm, *bap*

Received: 2020/04/22; Accepted: 2020/08/17; Published Online: 2020/09/26

## Corresponding Information:

Roya Safarkar, Department of biology, Islamic Azad University, Ardabil Branch, Ardabil, Iran.  
Email: Roya.Safarkar@yahoo.com



Copyright © 2020, This is an original open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribution of the material just in noncommercial usages with proper citation.

Use your device to scan and read the article online



Rouhi V, Safarkar R, Habibi S. Phenotypic Investigation of Biofilm Formation and Determination of Presence of *bap* and *bla<sub>OXA-51</sub>* Genes in *Acinetobacter baumannii* From Clinical Specimens in Tehran. Iran J Med Microbiol. 2020; 14 (6): 566 - 583

Download citation: [BibTeX](#) | [RIS](#) | [EndNote](#) | [Medlars](#) | [ProCite](#) | [Reference Manager](#) | [RefWorks](#)

Send citation to:  [Mendeley](#)  [Zotero](#)  [RefWorks](#)

## Introduction

*Acinetobacter baumannii* is an opportunistic pathogen that causes a wide range of infections including pneumonia, bacteremia, urinary tract infection, wound infection, and meningitis (1). *A. baumannii* has the ability to survive in the hospital environment and resist against various antibiotics, which causes a high prevalence of nosocomial infections (2).

The ability to form biofilm on medical equipment and devices is a significant agent in the pathogen of this bacterium (3). Many factors such as outer membrane protein A (*OmpA*), biofilm-related protein (*Bap*), beta-lactamase *PER-1*, etc. are involved in the formation of biofilm (4). Some of surface proteins like *ompA*, *bla<sub>PER-1</sub>*,

and *Bap* in addition to being involved in biofilm formation, are also involved in bacterial binding to human epithelial cells and non-living surfaces (5). Biofilm is a complex association of microbial colonies that lead to the formation of a cellular matrix, which is formed of a protective layer of polysaccharides (6). The sticky cell in the biofilm is located within an extracellular matrix, which is containing extracellular polymeric materials (EPS). Microbial cells are the main parts of biofilm that produce EPS, which include 50 to 90% of the total organic carbon in biofilm (7). So, biofilm formation is the main agent in bacterial survival and resistance (8). The *bap* gene is one of the most important biofilm producing and amplifying genes in *A. baumannii*. This protein with high molecular weight is located on the outer surface of the bacteria and contains a central nucleus including the successive repeats of similar sequences (9, 5).

There are various methods to evaluate the ability of biofilm formation by *A. baumannii*, which include the Agar Congo Red, Tube method, and Microtiter plate quantitative method that is the gold standard method for biofilm production (10). Molecular methods such as PCR have recently been applied to investigate and identify the genetic factors in biofilm formation. *A. baumannii* by expressing the *bap* gene decreases permeability and thereby causing resistance to a variety of bacteria, also causes high stability of the pathogen by creating high adhesion to biotic and abiotic surfaces (11).

The increasing prevalence of antibiotic-resistant isolates of *A. baumannii* producing biofilm in recent years in different geographical areas has led to failure in the treatment process. Considering the high prevalence of nosocomial infections caused by *A. baumannii* and also the spread of factors that increase resistance, the aim of this study was to investigate the frequency of *bap* and *bla*<sub>OXA-51</sub> genes in *A. baumannii* isolates, which isolated from nosocomial infections in Tehran.

## Materials and Methods

### Collection and identification of bacterial isolates

In this descriptive cross-sectional study, after approval in the ethics committee with the code IR.ARUMS.REC.1398.024, from May to November 2019, 165 isolates from blood, urine, trachea, sputum, pus, and wounds of hospitalized patients in different hospitals of Tehran were collected with 95% confidence level and 5% error rate.

Each isolate was cultured on McConkey agar and blood agar in the laboratory and was incubated for 24 hours at 37°C. Next, the presence of Gram-negative coccobacilli of *Acinetobacter* was confirmed microscopic direct Gram stain test. In order to detect the different species of *Acinetobacter*, IMVIC, catalase

and oxidase, SIM, VP, OF, TSI, urease and the growth was carried out at 37 and 42°C. The isolates with the reaction of lactose-negative, immobile, oxidase-negative, catalase-positive, indole-negative, pigment-negative, urease-negative, citrate-positive, H<sub>2</sub>S-negative, and VP-negative were isolated as *A. baumannii*. Furthermore, the *bla*<sub>OXA-51</sub> gene which is intrinsic to *A. baumannii* for final confirmation of the isolates in all isolates was detected.

### Phenotypic antibiotic susceptibility test

Determination of antibiotic susceptibility of the collected isolates was done by the disk diffusion method using antibiotic discs made by the company (Padtanteb, Iran) on Muller Hinton agar (Merck, Germany) and according to CLSI 2019 instructions (12). Tested antibiotics include: tobramycin (10 micrograms), cefepime (30 micrograms), imipenem (10 micrograms), meropenem (10 micrograms), amikacin (30 micrograms), gentamicin (10 micrograms), ciprofloxacin (5 micrograms), Were cefotaxime (30 µg) and ceftazidime (30 µg). In this method, a bacterial suspension with turbidity equivalent to a half McFarland was inoculated on the Muller-Hinton Agar medium in three directions. The cultured plates were kept at laboratory temperature for 20 minutes to remove excess moisture in the culture medium. Then, after placing the discs on the culture medium and incubating for 24 h at 37°C, the diameter of the growth inhibition zone for each antibiotic was recorded as sensitive, semi-sensitive and resistant according to the relevant instructions.

### Genotypic evaluation of the presence of *bla*<sub>OXA-51</sub> and *bap* genes

#### DNA extraction

To extract DNA, one to three colonies of bacterial isolates were boiled in 100 µL sterile water for 15 minutes and then placed in a bowl of ice for 15 minutes to induce a cold shock. Finally, it was centrifuged at 11,000 rpm for 2 minutes (13). After extraction, the DNA samples were kept at -20°C until doing PCR. Determining the Quantity of DNA extracted by nanodrop device (Thermo-2000c) was investigated.

#### Polymerase chain reaction (PCR)

The Polymerase chain reaction was used to investigate the presence of *bla*<sub>OXA-51</sub> and *bap* genes. To achieve this, oligonucleotide sequences of specific primers for these genes were used (14), which is shown in Table 1. In this study, a reaction mixture (Master mix\_CinnaGen) was used which included 1 µL of each primer (CinnaGen), 13 µL of the reaction mixture, 8 µL of double distilled water and 1 µL of DNA template were added and the final volume of the compounds was increased to 25 µL. And the mixture was placed in a thermocycler device (BIOER\_Model: TC-XP-G). The program process of PCR cycles of *bla*<sub>OXA-51</sub> gene was as

follows: primary degeneration for 5 minutes at 95°C and then 30 thermal cycles, including degeneration for 45 seconds at 94°C, binding of primer to DNA template for 45 seconds at 55°C, template strand elongation for 60 seconds at 72°C and final elongation temperature for 10 minutes at 72°C. The *bap* gene was replicated corresponding to the *bla<sub>OXA-51</sub>* gene, but at 1.45 seconds to elongate template strand.

**Table 1.** Characteristics of primers used in the study

Source	Size(bp)	Primer sequence	Primer
(14)	350	F:5'-TAATGCTTTGATCGGCCTTG-3' R:5'-TGGATGCACTTCATCTTGG-3'	<i>bla<sub>OXA-51</sub></i>
(14)	1449	F:5'-ATGCCTGAGATACAAATTAT-3' R:5'-GTCAATCGTAAAGGTAACG-3'	<i>bap</i>

### Phenotypic Investigation of Biofilm Production in *A. baumannii* Isolates

To investigate the biofilm formation ability of the strains, the tubular qualitative (TM) plate method and the quantitative tissue culture (TCP) method were applied.

#### Phenotypic Evaluation of biofilm production by microtiter plate method

A bacterial suspension equivalent to 0.5 McFarland was prepared in a nutrient broth medium and 200 µL was poured into each well. The microtiter plates were heated for 24 h at 37°C. After the heating period, the contents of each well were aspirated and the wells

Electrophoresis of PCR products was adjusted by 1.5% gel containing 1% DNA safe stain (CinnaGen) at 120 volts for 45 minutes and after this time the bands were photographed by transilluminator gel (E-BOX\_VX5). *A. baumannii* ATCC 19606 and a microtube containing reaction materials without the DNA template were applied as positive and negative controls, respectively.

were washed 5 times with sterile phosphate-buffered saline to remove all planktonic cells. After the wells were dried, 200 µL of 2% crystal violet was added to the wells and after 5 minutes, the wells were aspirated and washed with water. After the wells dried, 160 µL of acetic acid was added to bleach into the wells.

Finally, it was read by an ELISA plate reader at 650 nm. Then, according to Table 2, optical density (OD) of the isolates was compared to control optical absorption and reported as strong, medium, weak, and negative biofilm (15). *Pseudomonas aeruginosa* PA01 was used as a positive control in biofilm formation tests.

**Table 2.** Classification of the amount of the optical density ability to determine the biofilm formation

Lack of biofilm formation	OD ≤ OD (c)
Weak biofilm	OD (c) < OD ≤ 2 × OD (c)
Moderate biofilm	2 × OD (c) < OD ≤ 4 × OD (c)
Strong biofilm	4 × OD (c) < OD

#### Phenotypic Evaluation of Tubular Biofilm Production

First, 5 mL of the nutrient broth medium was transferred to sterile test tubes, and then 0.1 mL of microbial suspension was added to the tubes and heated at 37°C for 24 hours. After heating, the contents of each tube were aspirated and each tube was washed 5 times with phosphate-buffered saline. After drying, 10 mL of 2% crystal violet solution was added to each tube and after 5 minutes, the dye of crystal violet was removed and the tubes were washed and extracted with 33% acetic acid. Biofilm formation was analyzed qualitatively using this method. The intensity of the color remaining on the tube wall illustrates the formation of biofilm (16). *Pseudomonas aeruginosa* PA01 was used as a positive control in analyzing biofilm formation tests.

#### Statistical Analysis

Data were analyzed using SPSS software version 22 (SPSS Inc., Chicago, IL., USA) and t-test at a 95% confidence interval ( $P < 0.05$ ). And the Statistical correlation between biofilm formation ability in *A. baumannii* isolates was determined by the presence of *bap*, *bla<sub>OXA-51</sub>* genes, and the antibiotic resistance pattern of the isolates.

## Results

The characteristics of the isolates according to the type of sample and the patient's sex are presented in Table 3.

**Table 3.** Characteristic regarding the number and percentage of the sample distribution and sex of patients among *A. baumannii* isolates

Sample isolation place	Number of isolates divided from patients	Number of <i>Acinetobacter baumannii</i> isolates	Female		Male	
			Number	Percentage	Number	Percentage
Blood	33	30	18	%60	12	%40
Sputum	45	16	11	%68.75	5	%31.25
Urine	38	15	6	%40	9	%60
Trachea	5	1	1	%100	0	0
Wounds	19	7	5	%71.42	2	%28.57
Pus	25	4	3	%75	1	%25

### Phenotypic Evaluation of Antibiotic Resistance Pattern

Phenotypic evaluation of the antibiotic resistance patterns among *A. baumannii* strains indicated that the highest resistance was related to ceftazidime

(93.15%) and imipenem (94.52%) and the lowest resistance was related to amikacin (47.94%). The antibiotic resistance pattern of *A. baumannii* isolate is given in Table 4.

**Table 4.** Antibiotic susceptibility pattern of *A. baumannii* isolates

Antibiotics	Drug concentration	Number of sensitive strains	Number of intermediate strains	Number of resistant strains
		Frequency (percentage)	Frequency (percentage)	Frequency (percentage)
Tobramycin	10µg	17(23.28)	4(5.84)	52(71.23)
Cefepime	30µg	10(13.7)	0(0)	63(86/30)
Imipenem	10µg	2(2.73)	2(2.73)	69(94/52)
Meropenem	10µg	6(8.21)	0(0)	67(91/78)
Amikacin	30µg	24(32.88)	14(19.17)	35(47/95)
Gentamicin	30µg	11(15.06)	3(4.10)	59(80.82)
Ciprofloxacin	5µg	8(10.96)	19(26.02)	46(63.01)
Cefotaxime	30µg	5(6.84)	3(4.10)	65(89.04)
Ceftazidime	30µg	3(4/10)	2(2.73)	68(93.15)

### Polymerase Chain Reaction Test Results for *bla*<sub>OXA-51</sub> and *bap* Genes

The results of the polymerase chain reaction showed that the abundance of the *bla*<sub>OXA-51</sub> gene was traced in all 73 (100%) *A. baumannii* isolates. Also, the frequency of the *bap* gene was 39 isolates (53.42%). Correlation between the presence of *bap* genes and the ability to produce biofilm showed that from 73 studied isolates, 8 isolates with multiple drug resistance were able to form strong biofilm. Overall, the PCR results were consistent with the both TM and TCP methods. Four isolates of the blood samples by the PCR method had the *bap* gene, but they were

reported negative in phenotypic biofilm methods. The correlation of them was investigated using SPSS 22 statistical software and t-test, and the ability to form biofilm in resistant isolates was significantly higher than the sensitive isolates ( $P < 0.05$ ).

### Assessment of Biofilm Formation Through the Tubular Method

The results of tubular biofilm production depicted that from the 73 studied isolates in this study, 38 isolates (52.05%) were negative, 6 isolates (8.21%) were weak, 22 isolates (30.13%) were moderate, and 7 isolates (9.58%) were classified as strong biofilm producer.



**Figure 1.** Electrophoresis of PCR products to search for blaOXA-5 gene.

From the left side, the wells include negative control (C-), Ladder and positive control (C +), (*A. baumannii* ATCC 19606), respectively. The wells 1 to 6 are blood isolates, 7 is pus isolate, wells 8, 9, 10 are urine isolates, and wells are 11, 12 sputum isolates.

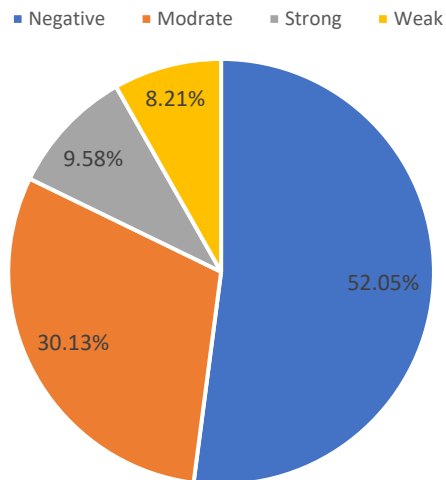


**Figure 2.** Electrophoresis of PCR products to search for tbaP gene. The wells from the right side include the negative control (C-), Ladder and positive control (C +) (*A. baumannii* ATCC 19606) and the isolates (wells 1 to 5 include blood isolates), respectively.

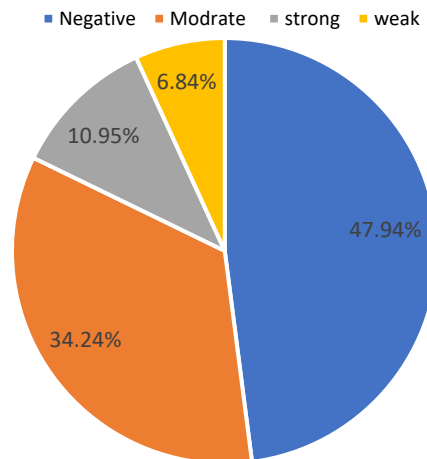
**Evaluation of Biofilm Formation using a Microtiter Plate Test Method**

The study results of microtiter plate production biofilm indicated that from 73 *A. baumannii* isolates, 35 isolates

(47.94%) were negative, 5 isolates (6.84%) were weak, 25 isolates (34.24%) were medium and 8 isolates (10.95%) were classified as strong biofilm producer. The results of both tubular and microtiter plate methods are given comparatively in Chart 1 and 2.



**Chart 1.** The rate of biofilm formation by a tubular method



**Chart 2.** Biofilm formation by microtiter plate method

**Amount of Biofilm Production in Plate Microtiter Method Based on Drug Resistance**

The comparison rate of biofilm formation in the studied strains was done by a quantitative microtiter

plate method with the rate of resistance and susceptibility of antibiotic (Figure 3). The results demonstrated that the rate of biofilm formation in antibiotic resistant strains is higher than antibiotic susceptible strains.

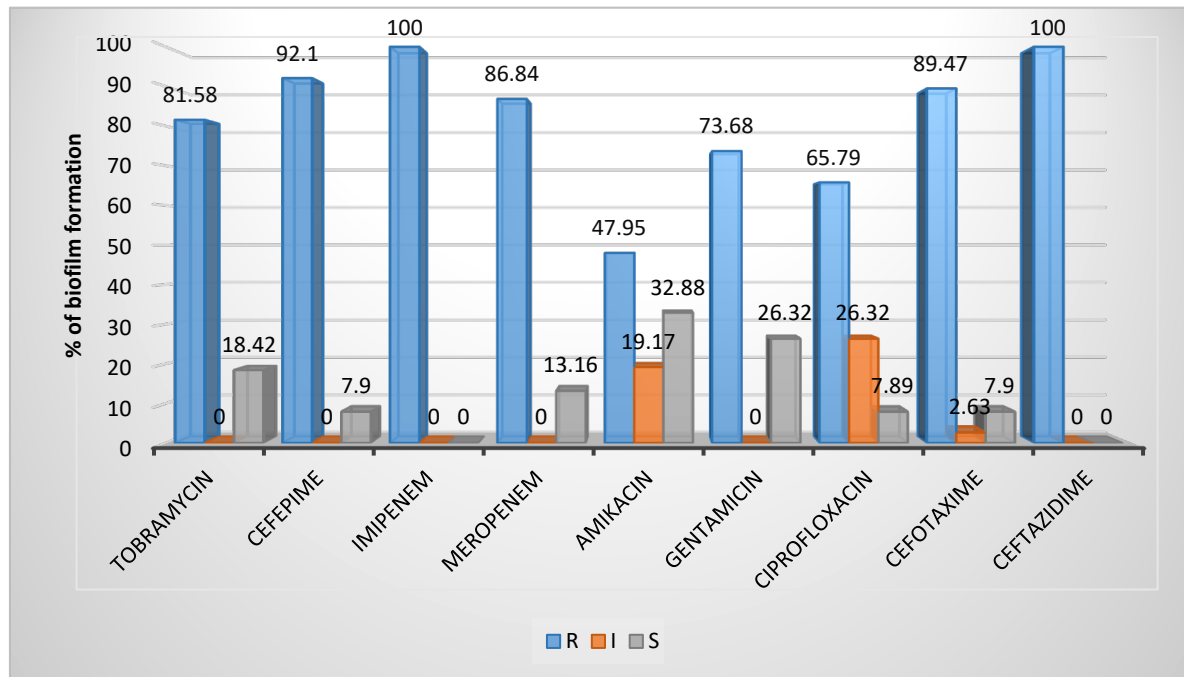


Figure 3. Comparison of drug resistance and drug sensitivity with the rate of biofilm production based on the microtiter plate method

Table 5. Comparison of biofilm formation results in phenotypic and molecular methods

Sample isolation place	Number of biofilm formation (percentage)				Presence of <i>bap</i> gene in isolated strains (percentage)
	Tubular		Microtiter plate		
	+	-	+	-	<i>bap</i>
Blood	11(36.66)	19(63.66)	12(40)	18(60)	12(%40)
Sputum	10(62.5)	6(37.5)	9(56.25)	7(43.75)	10(%62.5)
Urine	8(53.33)	7(46.66)	9(60)	6(40)	9(%60)
Trachea	0(0)	1(100)	0(0)	1(100)	0(0)
Wounds	4(57/14)	3(42.85)	5(71.42)	2(28.57)	5(%71.42)
Pus	2(50)	2(50)	3(75)	1(25)	3(%75)
Total	35(47.94)	38(52.05)	38(52.5)	35(47.94)	39(%53.42)

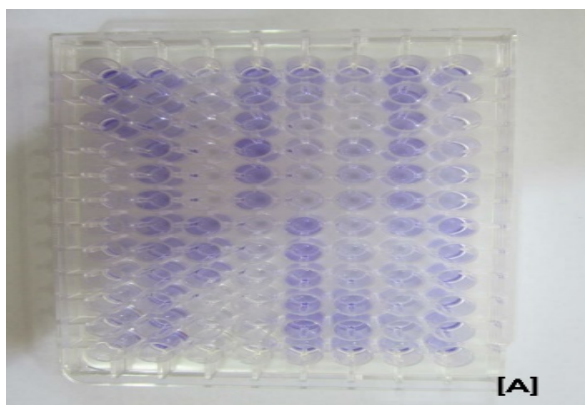


Figure 4. Investigation of biofilm formation by tubular and microtiter plate method

[A]: Biofilm formation in wells. [B]: Biofilm formation in tubes wall

## Discussion

Due to the increasing drug resistance to different antibiotics during recent years, we are witness to the isolates of *A. baumannii* with multiple drug resistance pattern (MDR) that are reported from around the world (17). Increasing resistance to antimicrobial agents and limited treatment options are serious problems in medical centers, especially in the intensive care unit (ICU), which affects the health and economy of the country (18). The ability to attach and form biofilm on mucus and medical devices is one of the main factors of virulence and drug resistance in *Acinetobacter* species. Bacterial biofilm causes the bacterium resistant to factors such as the presence of antibiotics, host immune response, phagocytic agents, and environmental stress (11).

The study of the biofilm formation ability and the detection of genes involved in various *Acinetobacter* isolates can help a better understanding of the process of biofilm formation. Consequently, one of the important purposes of this study was to investigate the rate of biofilm formation in the antibiotic-resistant clinical *A. baumannii* strains. The present study revealed that most isolates of *A. baumannii* have a multiple drug resistance pattern. The highest resistance to imipenem (94.52%) and the lowest resistance to amikacin (47.95%) were evaluated.

The presence of *A. baumannii* isolates with multiple drug resistance patterns has been reported in other studies in Iran. In the study of Hatami *et al.* in 2018, 84% of *A. baumannii* isolates represented multiple drug resistance (19). In a study that conducted by Goodarzi and colleagues in 2013, resistance to ceftazidime and meropenem was 99% and to imipenem was 91.5% (20), and in the study of Kooti *et al.* in 2015, resistance to ceftazidime and meropenem was 99.5% and to imipenem was 98.5% (1). Also, in the study of Maraki *et al.* conducted in Greece in 2015, the rate of resistance to cefotaxime and gentamicin was reported 96.2% and 91.5%, respectively (21), all of them indicate a very high resistance of this bacterium to a wide range of different antibiotics. In general, the rate of antibiotic resistance is higher in Asian and European countries than in the United States and Latin America, and this rate of resistance in Iran is very alarming (22). Many studies demonstrate the survival power of *A. baumannii* in harsh environmental conditions and very high resistance to various antibiotics caused by biofilm formation (23). The *bap* gene is one of the most important generating and amplifying genes of biofilm in *A. baumannii*. This protein with high molecular weight is located on the outer surface of bacteria and includes a central core consisting of sequential repeats of similar sequences (9). In recent years, many researchers have studied the relationship between *A. baumannii* antibiotic

resistance and involved genes in the biofilm production of this bacterium. Lihao Ki and colleagues conducted a study in 2016 on the association between antibiotic resistance, biofilm formation, and biofilm specific resistance in *A. baumannii*. In their study, the association between antibiotic resistance, biofilm formation, and biofilm specific resistance in clinical isolates of *A. baumannii* was assessed (24).

In a study by Ji Yong Song *et al.* in 2016, from 92 isolates of multidrug-resistant *A. baumannii*, all strains contained the *bap* gene (25). Also, in similar studies conducted in Australia and the United States in 2013 and 2015, the abundance of this gene was reported 92% and 84%, respectively (26,27). The frequency of the *bap* gene in the present study was 53.42%, which despite the mismatch between the prevalence of this gene in the studies outside of Iran with the present study, can be due to the different geographical conditions, number, or variety of samples. In the current study also, all *A. baumannii* isolates contained the *bla<sub>OXA-51</sub>* gene. In studies conducted by Amani *et al.* in 2018 and Hedayati *et al.* in 2019, they also reported a 100% abundance of *bla<sub>OXA-51</sub>*. Due to the existence of this gene in all isolates of *A. baumannii*, tracking of the gene is the quickest way to detect this bacterium (28, 29).

In order to evaluation of biofilm formation ability, the plate microtiter method was used. Additionally, the microtiter plate method detects the biofilm formation ability of isolates; it can measure the rate of biofilm formation quantitatively. In the current study by this method, 52.6% of the isolates formed biofilm and 47.94% of them were negative in biofilm formation. These results were similar to the findings of El Khair *et al.* In their study in 2015, 51.3% of the isolates were biofilm positive and 48.7% of the isolates were biofilm negative (30). The second was the tubular method, which used to evaluate the biofilm formation ability of *A. baumannii*. This method was able to identify biofilm in 47.95% of isolates also, 52.05% of the isolates were negative in biofilm formation, which was slightly different from the obtained results from the plate microtiter test. In this study, all isolates producing strong and moderate biofilm generally were contained *bap* gene. Considering the low frequency of the ability to form strong biofilm in the studied isolates, it is probable that other reasons such as changes in penicillin-binding proteins, decreased membrane permeability, production of antibiotic hydrolyzing enzymes, or expression of efflux pumps cause this amount of resistance.

**Research Limitations:** The lack of collaboration of the referral patients in completing the questionnaires

and the probability of using antibiotics by the patient were the limitations of this study.

### Conclusion

In the present study, the resistance rate of isolates was evaluated by a disk diffusion method and the correlation between resistant isolates with biofilm formation was compared, which indicating the formation of biofilm by most resistant isolates. Also, the frequency of the *bap* gene had a maximum consistent with the number of isolates forming biofilm. However, the *bap* gene is not the only gene involved in biofilm formation, but it can be said that it has a significant role in the formation of biofilm by this bacterium.

### Acknowledgment

The authors thank all those who helped them writing this article.

### Conflict of Interest

Authors declared no conflict of interests.

### Ethical considerations

Ethical issues (Including plagiarism, informed consent, misconduct, data fabrication and/or falsification, double publication and/or submission, redundancy, etc.) have been completely observed by the authors.

### Funding and support

This research resulted from an independent research without receiving any financial support.





## ارزیابی فنوتیپی تشکیل بیوفیلم و تعیین حضور ژن‌های *bla<sub>oxa-51</sub>* و *bap* در ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی* نمونه‌های بالینی در شهر تهران

وحید روحی<sup>۱</sup>، رویا سفرکار<sup>۱\*</sup>، ساناز حبیبی<sup>۲</sup>

۱. گروه زیست شناسی، واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، اردبیل، ایران  
۲. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رشت، ایران

### چکیده

### اطلاعات مقاله

**زمینه و اهداف:** *اسینتوباکتر بومانی*، کوکوباسیل گرم منفی غیر تخمیری 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 توانایی تشکیل بیوفیلم و تعیین فراوانی ژن *bap* و *bla<sub>oxa-51</sub>* در جدایه‌های بالینی *اسینتوباکتر بومانی* است.

**مواد و روش کار:** در این مطالعه توصیفی - مقطعی در سال ۹۸، تعداد ۱۶۵ ایزوله از بیمارستان‌های شهر تهران جمع‌آوری و آزمایشات تاییدی به منظور شناسایی باکتری انجام شد. بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها با روش انتشار دیسک در مقابل ۱۰ آنتی‌بیوتیک و همچنین توانایی تولید بیوفیلم به روش میکروتیتر پلیت و لوله‌های بررسی شد. سپس با روش‌های مولکولی، ژن‌های *bap* و *bla<sub>oxa-51</sub>* شناسایی شدند و میزان فراوانی آن‌ها بررسی گردید.

**یافته‌ها:** در این مطالعه از بین ۱۶۵ ایزوله بررسی شده ۷۳ ایزوله به عنوان *اسینتوباکتر بومانی* تایید شد. از بین ۷۳ ایزوله بیشترین مقاومت دارویی متعلق به ایمی‌پنم (۹۴/۵۲ درصد) بود. ژن‌های *bla<sub>oxa-51</sub>* و *bap* به ترتیب در ۱۰۰ و ۵۳/۴۲ درصد ایزوله‌ها ردیابی شدند. همچنین با استفاده از روش میکروتیتر پلیت ۸ (۱۰/۹۵ درصد) ایزوله و با استفاده از روش لوله‌های (۹/۵۸ درصد) ایزوله‌ها، توانایی تشکیل بیوفیلم قوی را داشتند.

**نتیجه‌گیری:** نتایج به دست آمده نشان داد که مطابق با مطالعات دیگر، تشکیل بیوفیلم در ایزوله *اسینتوباکتر بومانی* با حضور ژن *bap* همراه است.

**کلید واژه‌ها:** *اسینتوباکتر بومانی*، بیوفیلم، *bap*

کپی‌رایت © مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیر تجاری با ذکر منبع آزاد است.

**تاریخچه مقاله**  
دریافت: ۱۳۹۹/۰۲/۰۳  
پذیرش: ۱۳۹۹/۰۵/۲۷  
انتشار آنلاین: ۱۳۹۹/۰۷/۰۶  
موضوع: باکتری شناسی پزشکی

### نویسنده مسئول:

رویا سفرکار، گروه زیست شناسی، واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، اردبیل، ایران  
ایمیل: Roya.Safarkar@yahoo.com

### مقدمه

پروتئین‌های سطحی مانند *ompA*، *blaper-1* و *Bap* علاوه بر اینکه در تشکیل بیوفیلم نقش دارند، در اتصال باکتری به سلول‌های اپیتلیال انسانی و سطوح غیر زنده نیز نقش دارند (۵). بیوفیلم‌ها تجمع پیچیده‌ای از کلنی‌های میکروبی می‌باشند که منجر به تشکیل یک ماتریکس سلولی می‌شوند که از یک لایه محافظ پلی ساکاریدی تشکیل شده است (۶). سلول چسبنده در بیوفیلم درون یک ماتریکس خارج سلولی قرار دارد که حاوی مواد پلیمری خارج سلولی (EPS) است. سلول‌های میکروبی اجزای اصلی بیوفیلم‌ها هستند که EPS تولید می‌کنند که شامل ۵۰ تا ۹۰ درصد کل کربن آلی موجود در

اسینتوباکتر بومانی یک پاتوژن فرصت طلب است که باعث طیف گسترده‌ای از عفونت‌ها از جمله ذات‌الریه، باکتری می، عفونت ادراری، عفونت زخم و مننژیت است (۱). اسینتوباکتر بومانی توانایی زنده ماندن در محیط بیمارستانی و مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مختلف را دارد، و این امر موجب شیوع بالای عفونت بیمارستانی است (۲). توانایی تشکیل بیوفیلم روی تجهیزات و وسایل پزشکی عامل مهم بیماری‌زایی این باکتری است (۳). عوامل زیادی از جمله پروتئین غشای خارجی *A (OmpA)*، پروتئین مرتبط با بیوفیلم (*Bap*)، بتا-لاکتاماز *PER-1* و... در تشکیل بیوفیلم‌ها دخیل هستند (۴). برخی

بیوشیمیایی IMVIC، کاتالاز و اکسیداز، SIM، VP، OF، TSI، اوره، آز و رشد در ۳۷ و ۴۲ درجه سانتی گراد انجام شد. ایزوله‌هایی که دارای واکنش لاکتوز منفی، غیر متحرک، اکسیداز منفی، کاتالاز مثبت، اندول منفی، پیگمان منفی، اوره آز منفی، سیترات مثبت، H<sub>2</sub>S منفی، و VP منفی بودند به عنوان *اسینتوباکتر بومانی* جداسازی شدند. همچنین برای تایید نهایی ایزوله‌ها، ژن *bla<sub>OXA-51</sub>* که به صورت ذاتی در *اسینتوباکتر بومانی* وجود دارد در تمامی ایزوله‌ها شناسایی گردید.

### سنجش فنوتیپی حساسیت آنتی‌بیوتیکی

تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های جمع آوری شده با آزمون آنتی بیوگرام و با روش دیسک دیفیوژن با استفاده از دیسک‌های آنتی بیوتیکی ساخت شرکت (Padtanteb, Iran) بر روی محیط مولر هینتون آگار (Merck, Germany) و بر طبق دستورالعمل *CLSI2019* انجام گردید (۱۲). آنتی بیوتیک‌های آزمون شده شامل: توبرامایسین (۱۰ میکروگرم)، سفپیم (۳۰ میکروگرم)، ایمی‌پنم (۱۰ میکروگرم)، مروپنم (۱۰ میکروگرم)، آمیکاسین (۳۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم) بودند. در این روش سوسپانسیون باکتری با کدورت معادل نیم مک فارلند بر روی محیط مولر هینتون آگار در سه جهت تلقیح شد، پلیت‌های کشت داده شده به مدت ۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه نگه داشته شدند تا رطوبت اضافی موجود در محیط کشت از بین برود. سپس بعد از قراردادن دیسک‌ها بر روی محیط کشت و ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، قطر هاله عدم رشد برای هر آنتی بیوتیک مطابق با دستورالعمل مربوطه به عنوان حساس، نیمه حساس و مقاوم ثبت شد.

### ارزیابی ژنوتیپی حضور ژن *bla<sub>OXA-51</sub>* و *bap*

#### استخراج DNA

برای استخراج DNA، یک تا سه کلنی از ایزوله‌های باکتری در ۱۰۰ میکرولیتر آب استریل به مدت ۱۵ دقیقه جوشانده شد، سپس به مدت ۱۵ دقیقه به منظور ایجاد شوک سرمایی درون ظرف یخ قرار داده شد. در انتها برای مدت ۲ دقیقه در دور ۱۱۰۰۰ سانتریفیوژ شد (۱۳). پس از انجام مراحل استخراج DNA، نمونه‌ها تا زمان انجام PCR در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. تعیین کمیت DNA استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ (Thermo-2000c) بررسی شدند.

### واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR)

بیوفیلیم‌ها است (۷). لذا تشکیل بیوفیلیم عامل اصلی دخیل در بقا و مقاومت باکتریایی است (۸). ژن *bap* از جمله مهم‌ترین ژن‌های ایجادکننده و تقویت کننده بیوفیلیم در *اسینتوباکتر بومانی* است. این پروتئین با وزن مولکولی بالا در سطح خارجی باکتری‌ها قرار دارد و شامل هسته مرکزی متشکل از تکرارهای متوالی از توالی‌های مشابه است (۵، ۹). روش‌های مختلفی برای بررسی توانایی تشکیل بیوفیلیم توسط *اسینتوباکتر بومانی* وجود دارد که شامل روش‌های کنگورد آگار پلیت (Congo Red Agar)، کیفی لوله‌ای (Tube method) و روش کمی میکروتیتر پلیت (Micro titer plates) که روش استاندارد طلایی برای تولید بیوفیلیم است (۱۰). به تازگی برای بررسی و شناخت عوامل ژنتیکی دخیل در تشکیل بیوفیلیم از روش‌های مولکولی مانند PCR استفاده شده است. *اسینتوباکتر بومانی* با بیان ژن *bap* موجب کاهش نفوذپذیری و در نتیجه مقاومت به انواع باکتری‌ها می‌شود همچنین با ایجاد چسبندگی بالا به انواع سطوح زنده و غیر زنده موجب پایداری بالای عامل بیماری‌زا می‌شود (۱۱). در سال‌های اخیر افزایش شیوع ایزوله‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک *اسینتوباکتر بومانی* ایجاد کننده بیوفیلیم در مناطق جغرافیایی مختلف منجر به شکست در روند درمان شده است.

با توجه به شیوع بالای عفونت‌های بیمارستانی ناشی از *اسینتوباکتر بومانی* و همچنین گسترش عوامل افزایش دهنده مقاومت، مطالعه حاضر با هدف بررسی فراوانی حضور ژن‌های *bap* و *bla<sub>OXA-51</sub>* در ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی* جدا شده از عفونت‌های بیمارستانی در شهر تهران انجام گرفت.

### روش پژوهش

#### جمع آوری و شناسایی ایزوله‌های باکتری

در این مطالعه توصیفی-مقطعی پس از تصویب در کمیته اخلاق با کد IR.ARUMS.REC.1398.024، از اردیبهشت تا آبان ماه ۹۸، ۱۶۵ ایزوله، از خون، ادرار، ترشه، خلط، چرک و زخم بیماران بستری در بیمارستان‌های مختلف تهران با در نظر گرفتن سطح اطمینان ۹۵ درصد و میزان خطای ۵ درصد جمع آوری گردید.

در آزمایشگاه هر ایزوله روی محیط‌های مک کانکی آگار و بلاد آگار کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردیدند. سپس، با آزمایش مستقیم (رنگ آمیزی گرم) وجود کوکوباسیل‌های گرم منفی *اسینتوباکتر بومانی* به روش میکروسکوپی تایید شد. برای تشخیص گونه‌های مختلف *اسینتوباکتر بومانی* تست‌های

۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، طویل شدن رشته الگو در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه و دمای طویل شدن نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. تکثیر ژن *bap* نیز همانند ژن *bla<sub>oxa-51</sub>* ولی با زمان ۱.۴۵ ثانیه برای طویل شدن رشته الگو انجام شد.

الکتروفورز محصولات PCR توسط ژل ۱/۵ درصد حاوی DNA Safe Stain یک درصد (CinnaGen) در ولتاژ ۱۲۰ ولت به مدت ۴۵ دقیقه تنظیم شده و پس از گذشت این زمان باندها توسط دستگاه ژل ترنس لومیناتور (E-BOX\_VX5) عکس برداری شدند. برای کنترل مثبت از (*A.baumannii ATCC 19606*) و برای کنترل منفی از میکروتیوب حاوی مواد واکنش بدون DNA الگو استفاده گردید.

به منظور بررسی حضور ژن های *bla<sub>oxa-51</sub>* و *bap* از واکنش زنجیره ای پلیمرز استفاده شد. بدین منظور از توالی های اولیگونوکلئوتیدی پرایمرهای اختصاصی برای ژن های مذکور استفاده شد (۱۴)، که در جدول (۱) ارائه شده است. در این پژوهش از مخلوط واکنش (Master mix\_CinnaGen) استفاده گردید که شامل ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (CinnaGen)، ۱۳ میکرولیتر مخلوط واکنش، ۸ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر و ۱ میکرولیتر از DNA الگو اضافه و حجم نهایی ترکیبات به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد و مخلوط در دستگاه ترموسایکلر (BIOER\_Model: TC-XP-G) قرار گرفت. برنامه اجرایی سیکل های PCR ژن *bla<sub>oxa-51</sub>* به ترتیب زیر بود: واسرشتگی اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۰ سیکل حرارتی شامل واسرشتگی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمر به DNA الگو در

جدول ۱. مشخصات پرایمرهای استفاده شده در مطالعه

منبع	اندازه قطعه جفت باز (bp)	توالی پرایمر	پرایمر
(۱۴)	۳۵۰	F:5'-TAATGCTTTGATCGGCCTTG-3' R:5'- TGGATTGCACTTCATCTTGG-3'	<i>bla<sub>oxa-51</sub></i>
(۱۴)	۱۴۴۹	F:5'- ATGCCTGAGATACAAATTAT-3' R:5'- GTCAATCGTAAAGGTAACG-3'	<i>bap</i>

آسپیره شد و چاهک ها ۵ بار با بافر فسفات سالین استریل شستشو داده شدند تا همه سلول های پلانکتونیک خارج شوند. پس از خشک شدن چاهک ها، در مرحله بعد ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۲ درصد به چاهک ها اضافه شد و پس از ۵ دقیقه از چاهک ها آسپیره شده و توسط آب شسته شدند. پس از خشک شدن چاهک ها، به منظور رنگ بری به مقدار ۱۶۰ میکرولیتر استیک اسید به چاهک ها اضافه شد. و در نهایت توسط دستگاه ELISA plate reader در طول موج ۶۵۰ نانومتر خوانده شد. سپس طبق جدول (۲) جذب نوری (OD) جدایه ها با جذب نوری کنترل مقایسه شد و بصورت بیوفیلم های قوی، متوسط، ضعیف و منفی گزارش شد (۱۵). *Pseudomonas aeruginosa PAO1* به عنوان کنترل مثبت در آزمایش های بررسی تشکیل بیوفیلم استفاده شد.

### بررسی فنوتیپی تولید بیوفیلم در جدایه های /سینتو

#### باکتر بومانی

به منظور بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم سویه ها از روش کیفی لوله ای (TM) plate و روش کمی صفحه کشت بافت (TCP) استفاده شد.

### ارزیابی فنوتیپی تولید بیوفیلم به روش میکروتیتر پلیت

سوسپانسیون باکتری معادل ۰/۵ مک فارلند در محیط نوترینت برات آماده شد و مقدار ۲۰۰ میکرولیتر در هر چاهک ریخته شد. میکروتیتر پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرماگذاری شدند. پس از طی دوره گرماگذاری، محتوای هر چاهک

جدول ۲. طبقه بندی توانایی میزان جذب نوری تعیین کننده ی تشکیل بیوفیلم

عدم تشکیل بیوفیلم	OD ≤ OD (c)
بیوفیلم ضعیف	OD (c) < OD ≤ 2 × OD (c)
بیوفیلم متوسط	2 × OD (c) < OD ≤ 4 × OD (c)
بیوفیلم قوی	4 × OD (c) < OD

### ارزیابی فنوتیپی تولید بیوفیلم به روش لوله ای

ابتدا ۵ میلی لیتر از محیط کشت نوترینت برات به لوله های آزمایش استریل منتقل شدند، سپس ۱ / ۰ میلی لیتر از سوسپانسیون میکروبی به لوله ها اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه گرماگذاری شدند. پس از طی زمان گرماگذاری محتویات هر لوله آسپیره شد و هر لوله ۵ بار با بافر فسفات سالین شستشو داده شد و پس از خشک شدن ۱۰ میلی لیتر محلول کریستال ویوله ۲٪ به هر لوله اضافه شد و پس از ۵ دقیقه رنگ کریستال ویوله خارج شد و لوله ها شسته شده و با اسید استیک ۳۳ درصد رنگبری شد. با این روش تشکیل بیوفیلم به صورت کیفی ارزیابی شد. شدت رنگ باقی مانده در دیواره لوله نشان دهنده میزان تشکیل بیوفیلم است (۱۶). *Pseudomonas*

*aeruginosa PA01* به عنوان کنترل مثبت در آزمایش های بررسی تشکیل بیوفیلم استفاده شد.

### تجزیه و تحلیل آماری

داده های حاصل از نتایج با نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ و آزمون آماری T-test در سطح اطمینان ۰/۰۵ (Pvalue) مورد بررسی قرار گرفت و ارتباط آماری بین توان تشکیل بیوفیلم در ایزوله های اسینتوباکتر بومانی با حضور ژن های *bap* ، *bla<sub>OXA-51</sub>* و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله ها تعیین گردید.

### یافته ها

مشخصات جدایه ها با توجه به نوع نمونه و جنسیت بیماران در جدول ۳ ارائه شده است.

جدول ۳. مشخصات مربوط به تعداد و درصد پراکنش نوع نمونه و جنس بیماران در بین ایزوله های اسینتوباکتر بومانی

محل جداسازی نمونه	تعداد ایزوله های جدا شده		تعداد ایزوله های اسینتوباکتر بومانی		مرد
	از بیماران	بومانی	تعداد	درصد	
خون	۳۳	۳۰	۱۸	۶۰	۴۰
خلط	۴۵	۱۶	۱۱	۶۸/۷۵	۳۱/۲۵
ادرار	۳۸	۱۵	۶	۴۰	۶۰
تراشه	۵	۱	۱	۱۰۰	۰
زخم	۱۹	۷	۵	۷۱/۴۲	۲۸/۵۷
چرک	۲۵	۴	۳	۷۵	۲۵

### ارزیابی فنوتیپی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی

ارزیابی فنوتیپی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های اسینتوباکتر بومانی نشان داد که بیشترین مقاومت مربوط به آنتی بیوتیک های

سفتازیدیم (۹۳/۱۵ درصد) و ایمپنم (۹۴/۵۲ درصد) و کمترین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک آمیکاسین (۴۷/۹۴ درصد) بود. الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله اسینتوباکتر بومانی در جدول (۴) آورده شده است.

جدول ۴. الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله های اسینتوباکتر بومانی

آنتی بیوتیک	غلظت دارو	تعداد سویه های حساس	تعداد سویه های حدواسط	تعداد سویه های مقاوم
		فراوانی (درصد)	فراوانی (درصد)	فراوانی (درصد)
توبرامایسین	۱۰ μg	۱۷ (۲۳/۲۸)	۴ (۵/۸۴)	۵۲ (۷۱/۲۳)
سفیپم	۳۰ μg	۱۰ (۱۳/۷)	۰ (۰)	۶۳ (۸۶/۳۰)
ایمی پنم	۱۰ μg	۲ (۲/۷۳)	۲ (۲/۷۳)	۶۹ (۹۴/۵۲)
مروپنم	۱۰ μg	۶ (۸/۲۱)	۰ (۰)	۶۷ (۹۱/۷۸)
آمیکاسین	۳۰ μg	۲۴ (۳۲/۸۸)	۱۴ (۱۹/۱۷)	۳۵ (۴۷/۹۵)
جنتامایسین	۳۰ μg	۱۱ (۱۵/۰۶)	۳ (۴/۱۰)	۵۹ (۸۰/۸۲)
سیپروفلوکساسین	۵ μg	۸ (۱۰/۹۶)	۱۹ (۲۶/۰۲)	۶۶ (۹۳/۰۱)
سفوناکسیم	۳۰ μg	۵ (۶/۸۴)	۳ (۴/۱۰)	۶۵ (۸۹/۰۴)
سفتازیدیم	۳۰ μg	۳ (۴/۱۰)	۲ (۲/۷۳)	۶۸ (۹۳/۱۵)

چندگانه دارویی توانایی تشکیل بیوفیلم قوی را داشتند. در مجموع نتایج آزمون PCR، ژن *bab* با کمی اختلاف با روش های فنوتیپی میکروتیتر پلیت و لوله ای هم خوانی داشت. چهار ایزوله از نمونه های خون با روش PCR، دارای ژن *bab* بودند، اما در روش های فنوتیپی بیوفیلم منفی گزارش شدند. این ارتباط با استفاده از نرم افزار آماری SPSS 22 و آزمون T-test بررسی شد و توانایی تشکیل بیوفیلم در ایزوله های مقاوم به طور معنی داری بیش از ایزوله های حساس بود ( $P < 0/05$ ).



شکل ۲. نمایش الکتروفورز محصولات PCR جهت جستجوی ژن *bab*. چاهک ها به ترتیب از سمت راست شامل کنترل منفی (C-)، لدر و کنترل مثبت (*A.baumannii* ATCC 19606) (C+) و ایزوله ها (چاهک های ۱ تا ۵ شامل ایزوله های خون) می باشند.

### ارزیابی تشکیل بیوفیلم با روش تست میکروتیتر پلیت

همچنین نتایج بررسی توانایی تولید بیوفیلم به روش میکروتیتر پلیت نیز نشان داد که از ۷۳ ایزوله /سینتوباکتریومانی، ۳۵ ایزوله (۴۷/۹۴ درصد) بیوفیلم منفی، ۵ ایزوله (۶/۸۴ درصد) بیوفیلم ضعیف، ۲۵ ایزوله (۳۴/۲۴ درصد) بیوفیلم متوسط و ۸ ایزوله (۱۰/۹۵ درصد) بیوفیلم قوی بودند. نمودارهای نتایج هر دو روش لوله ای و میکروتیتر پلیت به صورت مقایسه ای در نمودارهای ۱ و ۲ آورده شده است.

### نتایج آزمون واکنش زنجیره ای پلیمرز برای ژن های

#### *bab* و *bla<sub>oxa-51</sub>*

نتایج واکنش زنجیره ای پلیمرز نشان داد که فراوانی ژن *bla<sub>oxa-51</sub>* در تمامی ۷۳ (۱۰۰ درصد) ایزوله سینتوباکتریومانی ردیابی شد همچنین فراوانی ژن *bab* ۳۹ ایزوله (۵۳/۴۲ درصد) است (شکل ۱، ۲).

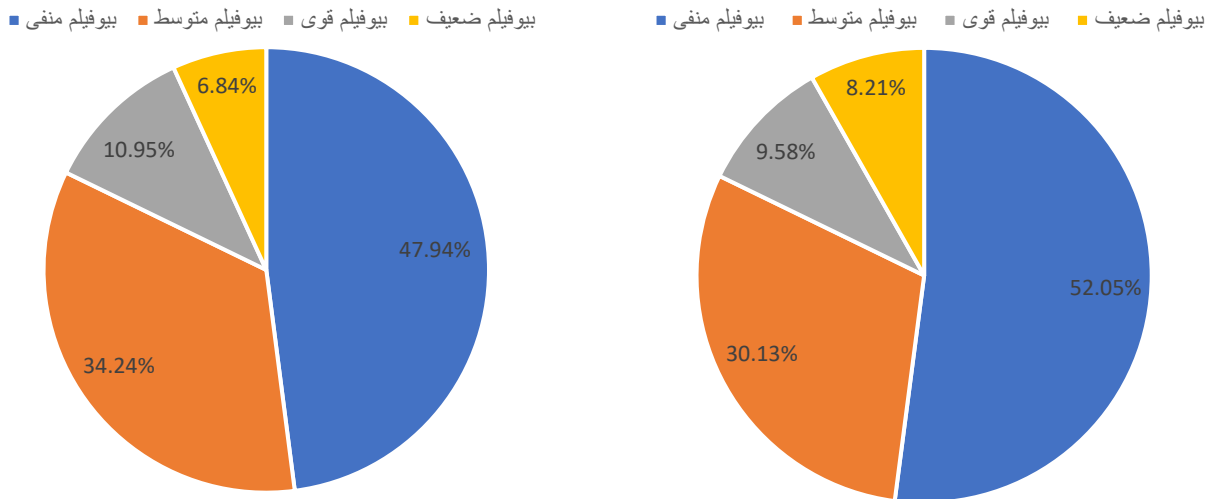
رابطه ی بین حضور ژن های *bab* و توانایی تولید بیوفیلم که از بین ۷۳ ایزوله بررسی شده، ۸ ایزوله با مقاومت



شکل ۱. نمایش الکتروفورز محصولات PCR جهت جستجوی ژن *bla<sub>oxa-51</sub>*. چاهک ها به ترتیب از سمت چپ شامل کنترل منفی (C-)، لدر و کنترل مثبت (*A.baumannii* ATCC 19606) (C+)، چاهک ۱ تا ۶ ایزوله خون، چاهک ۷ ایزوله چرک، چاهک ۸، ۹، ۱۰ ایزوله ادرار و چاهک های ۱۱، ۱۲ ایزوله خلط می باشند.

### ارزیابی تشکیل بیوفیلم با روش لوله ای

نتایج تولید بیوفیلم به روش لوله ای نشان داد که از ۷۳ ایزوله ی مورد بررسی در این تحقیق، ۳۸ ایزوله (۵۲/۰۵ درصد) بیوفیلم منفی، ۶ ایزوله (۸/۲۱ درصد) بیوفیلم ضعیف، ۲۲ ایزوله (۳۰/۱۳ درصد) بیوفیلم متوسط و ۷ ایزوله (۹/۵۸ درصد) بیوفیلم قوی بودند.



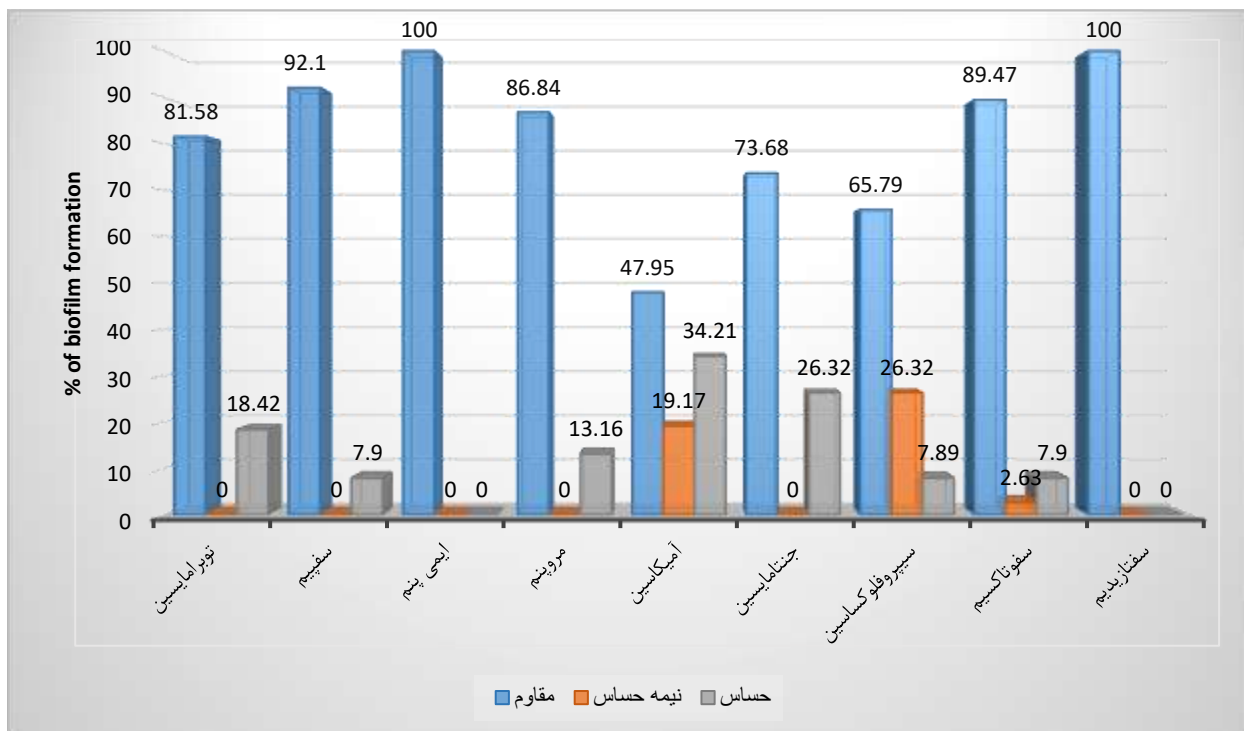
نمودار ۱. میزان تشکیل بیوفیلم به روش لوله ای

نمودار ۲. میزان تشکیل بیوفیلم به روش میکروتیتراپلیت

آنتی‌بیوتیکی انجام شد (نمودار ۳). نتایج نشان داد میزان تشکیل بیوفیلم در سویه های مقاوم به آنتی‌بیوتیک بالاتر از سویه های حساس به آنتی‌بیوتیک است.

### میزان تولید بیوفیلم در روش میکروتیتراپلیت بر اساس مقاومت دارویی

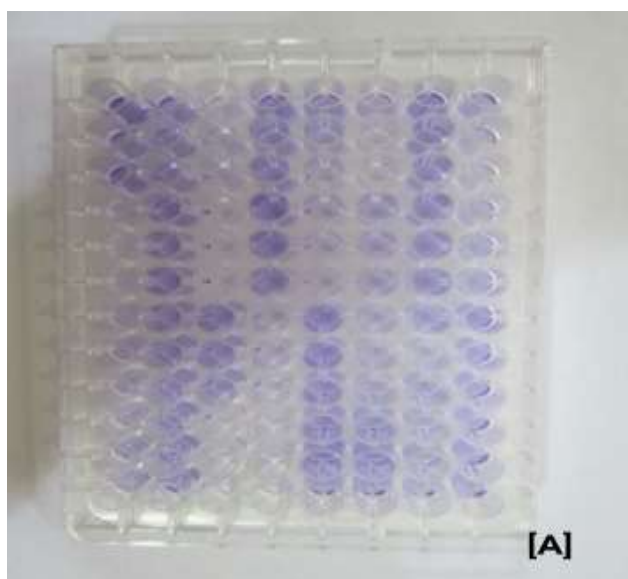
مقایسه میزان تشکیل بیوفیلم در سویه های مورد بررسی به روش کمی میکروتیتراپلیت با میزان مقاومت و حساسیت



نمودار ۳. مقایسه مقاومت و حساسیت دارویی با میزان تولید بیوفیلم بر اساس روش میکروتیتراپلیت

جدول ۵. مقایسه نتایج تشکیل بیوفیلم در روش های فنوتیپی و مولکولی

حضور ژن <i>bap</i> در سوبه های جداشده (درصد)		تعداد تشکیل بیوفیلم (درصد)				محل جداسازی نمونه
<i>bap</i>	میکروتیتراپلیت		لوله ای			
	منفی	مثبت	منفی	مثبت		
۱۲ (۴۰)	۱۸ (۶۰)	۱۲ (۴۰)	۱۹ (۶۳/۳۳)	۱۱ (۳۶/۶۶)	خون	
۱۰ (۶۲/۵)	۷ (۴۳/۷۵)	۹ (۵۶/۲۵)	۶ (۳۷/۵)	۱۰ (۶۲/۵)	خلط	
۹ (۶۰)	۶ (۴۰)	۹ (۶۰)	۷ (۴۶/۶۶)	۸ (۵۳/۳۳)	ادرار	
۰	۱ (۱۰۰)	۰	۱ (۱۰۰)	۰	تراشه	
۵ (۷۱/۴۲)	۲ (۲۸/۵۷)	۵ (۷۱/۴۲)	۳ (۴۲/۸۵)	۴ (۵۷/۱۴)	زخم	
۳ (۷۵)	۱ (۲۵)	۳ (۷۵)	۲ (۵۰)	۲ (۵۰)	چرک	
۳۹ (۵۳/۴۲)	۳۵ (۴۷/۹۴)	۳۸ (۵۲/۰۵)	۳۸ (۵۲/۰۵)	۳۵ (۴۷/۹۴)	جمع کل	



شکل ۳. بررسی تشکیل بیوفیلم به روش لوله ای و میکروتیتراپلیت. [A]: تشکیل بیوفیلم در چاهک ها. [B]: تشکیل بیوفیلم در دیواره لوله ها

تأثیر قرار می دهد (۱۸). توانایی چسبیدن و تشکیل بیوفیلم روی مخاط و وسایل پزشکی یکی از فاکتورهای اصلی ویروالانس و مقاومت دارویی در گونه های *اسینتوباکتر* است. بیوفیلم باکتریایی باعث می شود تا باکتری در برابر عواملی چون حضور آنتی بیوتیک ها، پاسخ ایمنی میزبان، عوامل فاگوسیت کننده و استرس های محیطی مقاومت کند (۱۱). مطالعه توانایی تشکیل بیوفیلم و مشخص کردن ژن های دخیل در آن در ایزوله های مختلف *اسینتوباکتر* می تواند به فهم بهتر فرایند تشکیل بیوفیلم کمک کند. بنابراین از اهداف مهم

### بحث

به علت افزایش روزافزون مقاومت دارویی نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف در سال های اخیر، شاهد حضور ایزوله هایی از *اسینتوباکتر بومانی* با الگوی مقاومت دارویی چندگانه (MDR) هستیم که از نقاط مختلف جهان گزارش می شوند (۱۷). افزایش مقاومت نسبت به عوامل ضد میکروبی و محدود بودن گزینه های درمانی، مشکلات جدی در مراکز درمانی به ویژه در بخش مراقبت های ویژه (ICU) است که سلامت و اقتصاد کشور را تحت

به چند دارو، تمامی سویه‌ها حاوی ژن *bap* بودند (۲۵). همچنین در مطالعات مشابهی که در استرالیا و ایالات متحده آمریکا در سال‌های ۲۰۱۳ و ۲۰۱۵ انجام شد، فراوانی این ژن به ترتیب ۹۲ و ۸۴ درصد گزارش شد (۲۶، ۲۷). در مطالعه حاضر فراوانی ژن *bap* ۵۳/۴۲ درصد بود که وجود عدم هم‌خوانی شیوع این ژن در مطالعات خارج از ایران با مطالعه حاضر می‌تواند به دلیل شرایط جغرافیایی متفاوت، تعداد و یا تنوع نمونه‌ها باشد. همچنین در مطالعه حاضر تمامی ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی* حاوی ژن *bla<sub>OXA-51</sub>* بودند. در مطالعاتی که Abdulzahra AT و همکاران در سال ۲۰۱۸ و Keshavarz-Hedayati و همکاران در سال ۲۰۱۹ انجام دادند نیز فراوانی این ژن را ۱۰۰ درصد گزارش کردند. به دلیل وجود این ژن در تمامی ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی*، ردیابی وجود این ژن سریع‌ترین راه برای تشخیص این باکتری به شمار می‌آید (۲۸، ۲۹).

به منظور بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم از روش میکروتیتیر پلیت استفاده شد. روش میکروتیتیر پلیت علاوه بر اینکه توانایی تشکیل بیوفیلم ایزوله‌ها را تشخیص می‌دهد، می‌تواند میزان تشکیل بیوفیلم را به صورت کمی اندازه‌گیری کند. با استفاده از این روش، در مطالعه حاضر، ۵۲/۶ درصد از ایزوله‌ها بیوفیلم تشکیل دادند و ۴۷/۹۴ درصد از ایزوله‌ها از نظر تشکیل بیوفیلم منفی بودند. این نتایج مشابه یافته‌های مطالعه El-Khier و همکاران بود. در این مطالعه در سال ۲۰۱۵، ۵۱/۳ درصد ایزوله‌ها بیوفیلم مثبت، و ۴۸/۷ درصد ایزوله‌ها بیوفیلم منفی گزارش شدند (۳۰). دومین روشی که برای بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم در *اسینتوباکتر بومانی* استفاده شد روش لوله‌ای بود. این روش توانست بیوفیلم را در ۴۷/۹۵ درصد ایزوله‌ها تشخیص دهد همچنین ۵۲/۰۵ درصد ایزوله‌ها بیوفیلم منفی بودند که با کمی اختلاف مشابه نتایج به دست آمده از آزمون میکروتیتیر پلیت بود.

در این مطالعه به‌طور کلی تمامی ایزوله‌های تولیدکننده بیوفیلم قوی و متوسط حاوی ژن *bap* بودند. با توجه به فراوانی پایین توانایی تشکیل بیوفیلم قوی در ایزوله‌های مورد بررسی، احتمال می‌رود دلایل دیگری همچون تغییر در پروتئین‌های متصل‌شونده به پنی‌سیلین، کاهش نفوذ پذیری غشاء، تولید آنزیم‌های هیدرولیزکننده آنتی‌بیوتیک یا بیان پمپ‌های افلاکس سبب ایجاد این میزان از مقاومت باشد.

**محدودیت پژوهش:** از محدودیت‌های اجرایی مطالعه نبود همکاری مراجعه‌کننده‌ها در تکمیل پرسشنامه‌ها و احتمال مصرف آنتی‌بیوتیک توسط بیمار بود.

این تحقیق، بررسی میزان تشکیل بیوفیلم در سویه‌های بالینی *اسینتوباکتر بومانی* مقام به آنتی‌بیوتیک بوده است.

مطالعه حاضر نشان داد که اکثر ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی* الگوی مقاومت دارویی چندگانه دارند. به طوری که بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک ایمپنم (۹۴/۵۲ درصد) و کمترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک آمیکاسین (۴۷/۹۵ درصد) ارزیابی شد. حضور ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی* با الگوی مقاومت دارویی چندگانه در دیگر مطالعات انجام شده در ایران نیز گزارش شده است. به طوری که در مطالعه Hatami و همکاران در سال ۲۰۱۸، ۸۴ درصد از ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی* مقاومت دارویی چندگانه را نشان دادند (۱۹). در مطالعه‌ای که Goudarzi و همکاران در سال ۲۰۱۳ انجام دادند مقاومت به سفنازیدم و مروپنم ۹۹ درصد و ایمپنم ۹۱/۵ درصد (۲۰)، و در مطالعه Kooti و همکاران در سال ۲۰۱۵ مقاومت به سفنازیدم و مروپنم ۹۹/۵ درصد و ایمپنم ۹۸/۵ درصد گزارش شد (۱). همچنین در مطالعه ماراکی و همکاران در سال ۲۰۱۵ که در یونان انجام شد میزان مقاومت نسبت به سفوتاکسیم و جنتامایسین به ترتیب ۹۶/۲ و ۹۱/۵ درصد گزارش شد (۲۱)، که همگی نشان‌دهنده مقاومت بسیار بالای این باکتری نسبت به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌های مختلف است. به‌طور کلی میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها در کشورهای آسیایی و اروپایی به نسبت ایالات متحده آمریکا و کشورهای آمریکای لاتین در سطح بالاتری است، و این میزان مقاومت در ایران بسیار نگران‌کننده است (۲۲).

بسیاری از مطالعات نشانگر قدرت بقای *اسینتوباکتر بومانی* در شرایط محیطی سخت و مقاومت بسیار بالا در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مختلف ناشی از تشکیل بیوفیلم هستند (۲۳). ژن *bap* از جمله مهم‌ترین ژن‌های ایجادکننده و تقویت‌کننده ی بیوفیلم در *اسینتوباکتر بومانی* است. این پروتئین با وزن مولکولی بالا در سطح خارجی باکتری‌ها قرار دارد و شامل هسته مرکزی متشکل از تکرارهای متوالی از توالی‌های مشابه است (۹). در سال‌های اخیر محققان بسیاری به بررسی ارتباط بین مقاومت آنتی‌بیوتیکی *اسینتوباکتر بومانی* و ژن‌های دخیل در تولید بیوفیلم این باکتری پرداختند. Qi L و همکاران در سال ۲۰۱۶ مطالعه‌ای مبنی بر ارتباط بین مقاومت آنتی‌بیوتیکی، تشکیل بیوفیلم و مقاومت ویژه بیوفیلم در *اسینتوباکتر بومانی* انجام دادند. در مطالعه آنها ارتباط بین مقاومت آنتی‌بیوتیکی، تشکیل بیوفیلم و مقاومت ویژه بیوفیلم در ایزوله‌های بالینی *اسینتوباکتر بومانی* بررسی گردید (۲۴). در مطالعه Sung JY و همکاران در سال ۲۰۱۶، از بین ۹۲ ایزوله *اسینتوباکتر بومانی* مقاوم



## نتیجه‌گیری

در این مطالعه میزان مقاومت ایزوله‌ها با روش دیسک دیفیوژن ارزیابی شد و ارتباط ایزوله‌های مقاوم با تشکیل بیوفیلم مقایسه گردید که نشان دهنده تشکیل بیوفیلم توسط اکثر ایزوله‌های مقاوم بود. همچنین فراوانی ژن *bap* با تعداد ایزوله‌های تشکیل دهنده بیوفیلم، مطابقت حداکثری را دارا بود. با این حال هرچند ژن *bap* تنها ژن دخیل در تشکیل بیوفیلم نیست، اما می‌توان گفت دارای نقش به‌سزایی در تشکیل بیوفیلم توسط این باکتری است.

## سیاسگزاری

بدین‌وسیله، از تمامی اشخاصی که بی‌ارائه نظرات ارزشمند، ما را یاری کردند قدردانی می‌شود.

## تعارض در منافع

این مقاله پژوهشی مستقل است که بدون حمایت مالی سازمانی انجام شده است. در انجام مطالعه حاضر، نویسندگان هیچ‌گونه تضاد منافی نداشته‌اند.

## Referance

- 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). [DOI:10.5812/ijm.20215v2]
- Cerqueira GM, Peleg AY. Insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenicity. *IUBMB life*. 2011;63(12):1055-60. [DOI:10.1002/iub.533] [PMID]
- 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 [DOI:10.1111/j.1574-6976.2012.00344.x] [PMID]
- Gaddy JA, Actis LA. Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Future Microbiol*. 2009;4(3):273-8. [DOI:10.2217/fmb.09.5] [PMID] [PMCID]
- Brossard KA, Campagnari AA. The *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein plays a role in adherence to human epithelial cells. *Infect Immun*. 2012;80(1):228-33 [DOI:10.1128/IAI.05913-11] [PMID] [PMCID]
- Ford M. *Med Microbiol*. Oxford University Press; 2014.
- Zhao C, Xing M, Yang J, Lu Y, Lv B. Microbial community structure and metabolic property of biofilms in vermicultivation for liquid-state sludge stabilization using PLFA profiles. *Bioresour Technol*. 2014; 151:340-6. [DOI:10.1016/j.biortech.2013.10.075] [PMID]
- Thummeepak R, Kongthai P, Leungtongkam U, Sitthisak S. Distribution of virulence genes involved in biofilm formation in multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Int Microbiol*. 2016 ;19(2):121-9.
- Loehfelm TW, Luke NR, Campagnari AA. Identification and characterization of an *Acinetobacter baumannii* biofilm associated protein. *J. Bacteriol*. 2008; 190: 1036-1044. [DOI:10.1128/JB.01416-07] [PMID] [PMCID]
- Dadgar T, Vahedi Z, Yazdansetad S, Kiaei E, Asaadi H. Phenotypic Investigation of Biofilm Formation and the Prevalence of *icaA* and *icaD* Genes in *Staphylococcus epidermidis* Isolates. *Iran J Med Microbiol*. 2019; 12 (6) :371-381 [DOI:10.30699/ijmm.12.6.371]
- 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*. *Pathobiol Res*. 2014 ;16(4):15-26.
- Wayne PA. Clinical and laboratory standards institute, performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 29th informational supplement M100, CLSI, 2019.
- Ranjbar R, Memariani M. Multilocus variable-number tandem-repeat analysis for genotyping of *Shigella sonnei* strains isolated from pediatric patients. *Gastroenterology and hepatology from bed to bench*. 2015;8(3): 225. [DOI:10.26226/morressier.56d5ba2dd462b80296c94fd4]
- Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents*. 2006 ;27(4):351-3. [DOI:10.1016/j.ijantimicag.2006.01.004] [PMID]
- Heidari H, Hadadi M, Ebrahim-Saraie HS, Mirzaei A, Taji A, Hosseini SR, Motamedifar M. Characterization of virulence factors, antimicrobial resistance patterns and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus* spp. strains isolated from corneal infection. *J francais d'ophtalmologie* 2018 ;41(9):823-9 [DOI:10.1016/j.jfo.2018.01.012] [PMID]
- Ruchi T, Sujata B, Anuradha D. Comparison of phenotypic methods for the detection of biofilm production in uro-pathogens in a tertiary care hospital in India. *Int J Curr Microbiol App Sci*. 2015;4(9):840-49.
- Asif M, Alvi IA, Rehman SU. Insight into *Acinetobacter baumannii* pathogenesis global resistance mechanisms of resistance, treatment options, and alternative modalities.

- Infect Drug Resist. 2018; 11:1249. [[DOI:10.2147/IDR.S166750](https://doi.org/10.2147/IDR.S166750)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
18. Cornejo-García JA, Perkins JR, Jurado-Escobar R, García-Martín E, Agúndez JA, Viguera E, et al. Pharmacogenomics of prostaglandin and leukotriene receptors. *Front Pharmacol.* 2016; 7:316. [[DOI:10.3389/fphar.2016.00316](https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00316)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
  19. Hatami R. The frequency of multidrug-resistance and extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in west of Iran. *J Clin Microbiol Infect Dis.* 2018;1(1):4-8.
  20. Goudarzi H, Douraghi M, Ghalavand Z, Goudarzi M. Assessment of antibiotic resistance pattern in *Acinetobacter baumannii* carrying bla<sub>oxA</sub> type genes isolated from hospitalized patients. *Novelty Biomed.* 2013;1(2):54-61.
  21. Maraki S, Mantadakis E, Mavromanolaki VE, Kofteridis DP, Samonis G. A 5-year surveillance study on antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from a tertiary Greek hospital. *J Infect Chemother.* 2016 S;48(3):190-8.
  22. Goudarzi M, Azimi H. Dissemination of classes 1, 2, and 3 integrons in *Acinetobacter baumannii* strains recovered from intensive care units using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Jundishapur J Microbiol.* 2017;10(5). [[DOI:10.5812/jjm.13100](https://doi.org/10.5812/jjm.13100)]
  23. Longo F, Vuotto C, Donelli G. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. *New Microbiol.* 2014; 37(2):119-27
  24. Qi L, Li H, Zhang C, Liang B, Li J, Wang L, et al. Relationship between antibiotic resistance, biofilm formation and biofilm-specific resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Front Microbiol.* 2016; 7:483 [[DOI:10.3389/fmicb.2016.00483](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00483)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
  25. Sung JY, Koo SH, Kim S, Kwon GC. Persistence of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates harboring bla<sub>OXA-23</sub> and bap for 5 years. *J Microbiol Biotechnol.* 2016; 26(8):1481-9. [[DOI:10.4014/jmb.1604.04049](https://doi.org/10.4014/jmb.1604.04049)] [[PMID](#)]
  26. Goh HS, Beatson SA, Totsika M, Moriel DG, Phan MD, Szubert J, et al. Molecular analysis of the *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein. *Appl. Environ Microbiol.* 2013;79(21):6535-43. [[DOI:10.1128/AEM.01402-13](https://doi.org/10.1128/AEM.01402-13)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
  27. Luo TL, Rickard AH, Srinivasan U, Kaye KS, Foxman B. Association of bla<sub>OXA-23</sub> and bap with the persistence of *Acinetobacter baumannii* within a major healthcare system. *Front Microbiol.* 2015; 6:182. [[DOI:10.3389/fmicb.2015.00182](https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00182)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
  28. Keshavarz-Hedayati S, Shapouri R, Habibollah-Pourzeshki N, Bigverdi R, Peymani A. Molecular investigation of resistance to disinfectants in *Acinetobacter Baumannii* isolates collected from Qazvin hospitals, Iran 2017. *J Qazvin Univ Med Sci.* 2019;23(1):2-13. [[DOI:10.32598/JQUMS.23.1.2](https://doi.org/10.32598/JQUMS.23.1.2)]
  29. Abdulzahra AT, Khalil MA, Elkhatib WF. First report of colistin resistance among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates recovered from hospitalized patients in Egypt. *New Microbes New Infect.* 2018; 26:53-8. [[DOI:10.1016/j.nmni.2018.08.007](https://doi.org/10.1016/j.nmni.2018.08.007)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
  30. El-Khier NTA, ElKazzaz SS, Elganainy AE. Phenotypic and Genotypic Detection of Biofilm Formation in *Staphylococcus epidermidis* Isolates from Retrieved Orthopaedic Implants and Prostheses. *Br Microbiol Res J.* 2015; 9(4): 1-10. [[DOI:10.9734/BMRJ/2015/18650](https://doi.org/10.9734/BMRJ/2015/18650)]