

# 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

Haniyeh Mozafari<sup>1</sup>, Shiva Mirkalantari<sup>1</sup> , Behrooz Sadeghi Kalani<sup>1</sup> , Nour Amirmozafari<sup>1\*</sup> 

1. Department of Microbiology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

doi [10.30699/ijmm.15.3.266](https://doi.org/10.30699/ijmm.15.3.266)



## ABSTRACT

**Background and Aim:** *Acinetobacter baumannii* is considered to be a re-emerging causative agent of nosocomial infections. There is a significant relation between pathogenicity of this bacterium and the numerous virulence factors. The purpose of this study was to investigate nine virulence factor genes in *A. baumannii* isolates derived from hospitalized patients.

**Materials and Methods:** A total of 50 *A. baumannii* isolates were recovered from patients with pneumonia in Imam Khomeini Hospital, Tehran, Iran. Following biochemical and microbiological identification of the bacteria, Multiplex PCR was performed for *basD*, *plD*, *csuA* genes, *surA*, *pbpG*, *bfmR* genes, and *bap*, *ompA* genes using specific sets of primers which were specifically designed for this study. The *espA* was identified separately by a Uniplex PCR assay. All amplified DNA fragments were sequenced for the products' confirmation.

**Results:** Among the 50 clinical isolates of *A. baumannii* studied, *bfmR* and *pbpG* genes were reported in all samples (100%), *bap*, *plD*, *surA*, and *csuA* genes were collected from 49 samples (98%), 48 (96%) of these isolates had *ompA* and *basD* genes, and *espA* gene was observed in only five isolates (10%).

**Conclusion:** According to this study results, virulence factors genes in clinical *A. baumannii* have a prevalence rate more than 90%. Additionally, the high incidence rate of those genes related to biofilm formation indicates that most clinical strains have the ability to form biofilm structures.

**Keywords:** *Acinetobacter baumannii*, Multiplex Polymerase Chain Reaction, *Pneumonia*, Virulence Factors

Received: 2021/01/04; Accepted: 2021/02/13; Published Online: 2021/06/28

Corresponding Information: Dr Nour Amirmozafari, Department of Microbiology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.  
Email: [amirmozafari@iums.ac.ir](mailto:amirmozafari@iums.ac.ir)



Copyright © 2021. 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



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): 266-280.

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

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

## Introduction

*Acinetobacter baumannii* is an aerobic non-fermenting gram-negative coccobacillus belonging to the family Moraxellaceae. This opportunistic bacterium is usually isolated from the hospital environment and hospitalized patients. Acinetobacters, especially *A. baumannii*, are a part of the natural skin flora, which can localize the mouth cavity, pharynx,

and tonsil. This point is important in terms of epidemiology and nosocomial infections [1].

Some of the most important infections caused by this bacterium include endocarditis, meningitis, pneumonia, bacteremia, and urinary infection [2]. Over 43% of healthy people have this organism on the

surface of their body [3]. *A. baumannii* is considered one of the remarkable problems in nosocomial infections in the world due to antibiotic resistance. The clinical significance of this bacterium is seriously threatening, especially during the last 11 years because of acquiring antibiotic resistance genes [4].

This pathogen produces biofilm-associated (Bap) protein by the *bap* gene that starts biofilm formation following *A. baumannii* attachment to cellular surfaces. Outer membrane protein A (OmpA), expressed by the *ompA* gene, is an adhesion protein, which plays an important role in biofilm formation on the surface of epithelial cells. Exopolysaccharide (Esp) is coded by the *espA* gene in high levels on cell surfaces and protects the cell against different types of environmental damage. Esp protein is involved in the aggregation and biofilm formation by this bacterium. Rapee Thummeepak et al. in 2016 reported 84.4%, 48%, and 30.2% of *ompA*, *bap*, and *espA* in 255 clinical samples, respectively [5].

The Csu protein generates a secretory system, including chaperone and usher, which are needed for the production of pili and formation of biofilm on surfaces. The expression of this protein is controlled by a regulatory system of two components named Bfms/BfmR that entails a kinase-sensor coded by *bfmS* and a response regulator coded by *bfmR*. This system is applied for bacterial biofilm formation on polystyrene surfaces. It has been demonstrated in previous studies that inactivating the *bfmR* gene leads to the cessation of pili production, adhesion, and biofilm formation on plastic surfaces. The frequency of this gene has been reported to be high in clinical isolates. Thummeepak et al. found a frequency of 84% for this gene [6].

Other virulence factors encompass iron acquisition system (*basD*), phospholipase D (*slpD*), surface

antigen protein A (*surA*), and penicillin-binding protein G (*bpbG*) [7, 8]. Therefore, the present study aimed to identify nine diverse virulence genes in *A. baumannii* isolates isolated from patients with pneumonia hospitalized in the Intensive Care Unit (ICU) of Imam Khomeini Hospital, Tehran, Iran.

## Materials and Methods

### Isolation and Identification of Isolates

A total of 50 isolates of *A. baumannii* were randomly selected from the microorganisms collection of the Iran University of Medical Sciences. These bacteria were selected from the clinical samples of the respiratory system of patients who referred to Imam Khomeini Hospital, Tehran, Iran during 2018-2019 [9]. Biochemical tests, including oxidase, catalase, anaerobic oxidation-fermentation (OF), aerobic OF, triple sugar iron (TSI), indole, motility, culture on Simmons Citrate agar, Voges-Proskauer, methyl red, culture on MacConkey agar, and lactose test (Merck, Germany) were performed to ensure correct colony selection. Finally, 50 *A. baumannii* isolates were identified and confirmed [10].

### Primers Designing

The target sites for *A. baumannii* primers were chosen as nine specific genes, namely *bap*, *ompA*, *basD*, *espA*, *bfmR*, *lpD*, *csuA*, *pbpG*, and *surA*. Following the determination of target sites for primer designing, databases of each bacterium were searched on NCBI. The Oligo 2, Oligoanalyzer, and Gene Runner softwares were applied to assess the annealing and Tm temperatures of primers (Table 1). Next, blasting with human, fungal, viral, and microorganism samples was performed with NCBI databases for the designed primers.

**Table 1.** Sequences of primers used for identifying specific genes in *A. baumannii* isolates

Gene	Primer Sequence	Product Size	Reference
<i>OmpA</i>	F: GCTGGTGTGGTGCTTTCTG R: TCGGTTGATCCCAAGCGAAA	490	This study
<i>Bap</i>	F: TGAAAGTGGCTGCCAGTGAT R: TCTGCGTCAGCGTCACTATC	223	This study
<i>EspA</i>	F: CAGCTTTAGGTCTTGCGGGA R: TGCTAAACCGAAGTCGCCAA	392	This study
<i>PbpG</i>	F: TGGATGCGCAAACAGGTGAA R: GGTCGGTGTGGTTGAGAACT	467	This study
<i>BasD</i>	F: TGCTGTTCTGTTCTTTGGCG R: GTTGAGTTTGAGCGCGGATG	517	This study
<i>PlD</i>	F: GCTGTGGCTTTGACAGGTTG R: TAGCGCAAACGGTGTGTGTTG	695	This study
<i>BfmR</i>	F: ACCGATGGTAACCGTGCAAT R: TCTGCACCCATTTCCAGACC	194	This study
<i>SurA</i>	F: GATGCGATTGCACCTGGAAC R: TTGACGTGCCATACGCTCTT	822	This study
<i>CsuA</i>	F: TGGTGAAGCTACCACAGGTT R: ACGACTACCATCATGGGCTG	322	This study

### DNA Extraction from *A. baumannii* Isolates

First, colonies of all *A. baumannii* isolates were separately cultured in microtubes containing 2 mL of Tryptic Soy Broth (TSB) medium and were incubated at 37°C for 24 h, which followed by the extraction of genomic DNA from colonies by the boiling method.

First, bacterial suspension was centrifuged at 10000 rpm for 10 min after 24 h incubation. Afterwards, 1 mL of the supernatant was discarded and 1 mL distilled water was added to the bacterial precipitate. This procedure was performed twice. Next, 200 µL of TE sterile buffer (pH: 8) was added to the bacterial precipitate. Microtubes containing precipitate and TE buffer were boiled at 100°C for 10 min and were immediately transferred to the temperature of -20°C for 5 min. The process of boiling and cooling was repeated three times. Afterwards, the microtubes that contained bacterial precipitation were centrifuged at 14000 rpm. Finally, the supernatant containing genomic DNA was collected in a sterile microtube for polymerase chain reaction (PCR). In order to determine the purity of extracted DNA, electrophoresis and biophotometer were carried out.

### Multiplex PCR

PCR was performed using Taq DNA Polymerase Master Mix (Amplicon, Denmark) which consists of MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, Taq polymerase, and buffer. The final volume of each reaction for completing multiplex PCR was 25 µL containing 12 µL Master Mix for all reactions. Moreover, 0.3 µL at the concentration of 10 pM was poured in a microtube from each forward and reverse primer of *ompA* gene with 1 µL of both primers for *bap* gene. In addition, 0.5 µL of both reverse and forward primers of the three genes *csuA*, *plD*, and *basD* were poured into another tube.

The amounts of 1, 0.5, and 0.5 µL of the reverse and forward primers of *pbpG*, *bfmR*, *surA* genes were added to the third microtube, respectively. A volume of 0.5 µL of each primer of the *espA* gene was poured into another tube. The *espA* gene was evaluated separately and not as multiplex. The final concentration for each primer was 100 µmol. After that, 1 µL DNA at the concentration of 200 ng/L and 1 µL double-distilled water free of any nuclease was added to each reaction mixture to reach the intended final volume.

Multiplex PCR was carried out as follow: 1) primary denaturation for 5 min at 95°C, 2) 34 denaturation cycles of 40 sec at 95°C, 3) annealing for 45 sec (annealing temperature was determined as 59°C for all nine genes, 4) polymerization for 45 sec at 72°C, and 5) final polymerization for 5 min at 72°C. Afterwards, PCR products were electrophoresed on 1% agarose gel containing safe stains and were

visualized by gel documentation. The PCR products were finally sent to Pishgam Co. (Iran) for sequencing.

### Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the SPSS software version 22 (IBM, Chicago, Ill., USA). The relationship between antibiotic resistance and the frequency of *ompA*, *bap*, *bfmR*, *espA*, *basD*, *surA*, *pbpG*, *csuA*, and *plD* was assessed by the t-test.

## Results

### Identification of *A. baumannii*

Microbiologic and biochemical tests were performed for the definite determination of 50 *A. baumannii* isolates collected from the respiratory system of patients. In the laboratory, all 50 isolates were cultured on MacConkey agar and blood agar and were incubated at 37°C for 24 h. After that, the presence of Gram-negative coccobacilli *A. baumannii* was confirmed by a microscope. Next, biochemical tests, such as IMViC, urease, TSI, OF, MR, VP, SIM, catalase, oxidase, and growth at 37°C and 42°C were conducted to diagnose diverse species of *Acinetobacter*.

Isolates that were lactose negative, non-motile, oxidase negative, catalase positive, indole negative, pigmentation negative, urease positive, citrate positive, H<sub>2</sub>S negative, and MR negative were confirmed. The results of microbiologic and biochemical tests demonstrated that all 50 samples were *A. baumannii* and stored at -70°C in Peptone Water medium containing 30% glycerol.

### Results of PCR for Specific Genes

All samples identified as *A. baumannii* by biochemical tests were tested by multiplex PCR for *ompA*, *bap*, *bfmR*, *plD*, *basD*, *espA*, *csuA*, *pbpG*, and *surA* genes. The results of multiplex PCR revealed that the genes *bfmR*, *bap*, *ompA*, and *csuA* involved in biofilm formation had the frequencies 100%, 98%, 96%, and 98%, respectively. Gene *espA* was found to have the lowest frequency of 10% among the isolates. The lengths of products are demonstrated in [Table 1](#).

According to the findings of previous studies, the *bap* gene is the most important gene for biofilm formation [5]. The frequency of this gene was very high in the current study (98%) and only one isolate lacked this gene. The frequency of other investigated genes in the present study was 98%, 96%, 98%, and 100% for *plD*, *basD*, *surA*, and *pbpG*, respectively ( $P<0.05$ ) ([Figures 1-5](#)). For all negative specimens, PCR was repeated twice as a single gene. The frequency of genes *basD*, *bfmR*, *bap*, *ompA*, *plD*, *csuA*, *pbpG*, and *surA* was 82% ([Table 2](#)). The PCR products were finally sent to Pishgam Co. for sequencing. The findings of sequencing showed a similarity of over 80% in isolates ( $P<0.05$ ) ([Figure 6](#)).

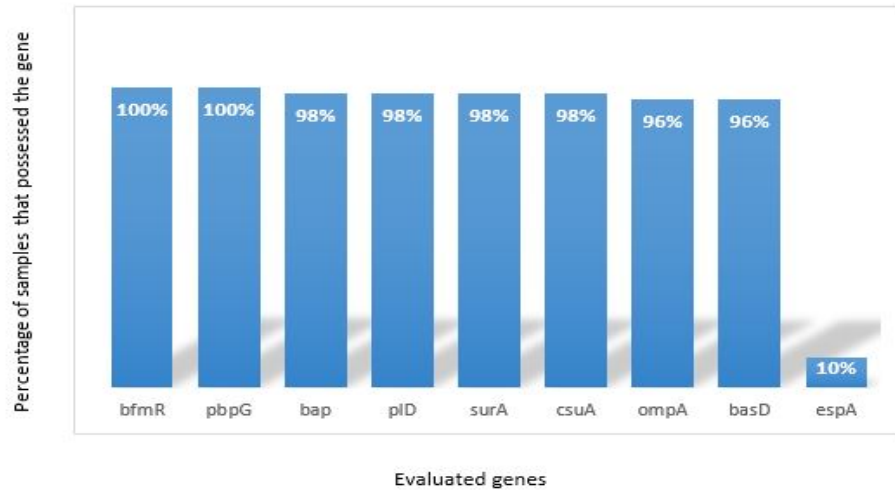


Figure 1. Frequency of studied genes in *A. baumannii* isolated from patients

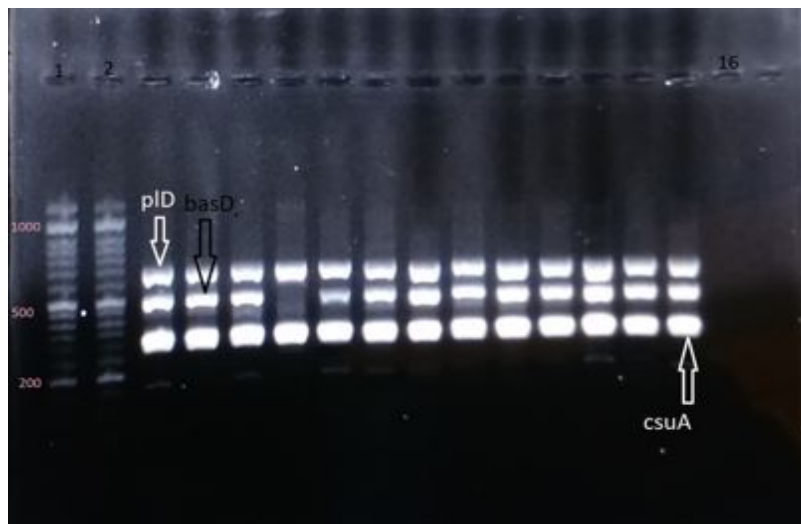


Figure 2. Electrophoresis gel of the PCR products of genes *plD* (the segment of 695 base pair), *basD* (the segment of 517 base pair), *csuA* (the segment of 322 base pair); columns 1 and 2: DNA marker of 1000 base pair; column 16: negative control

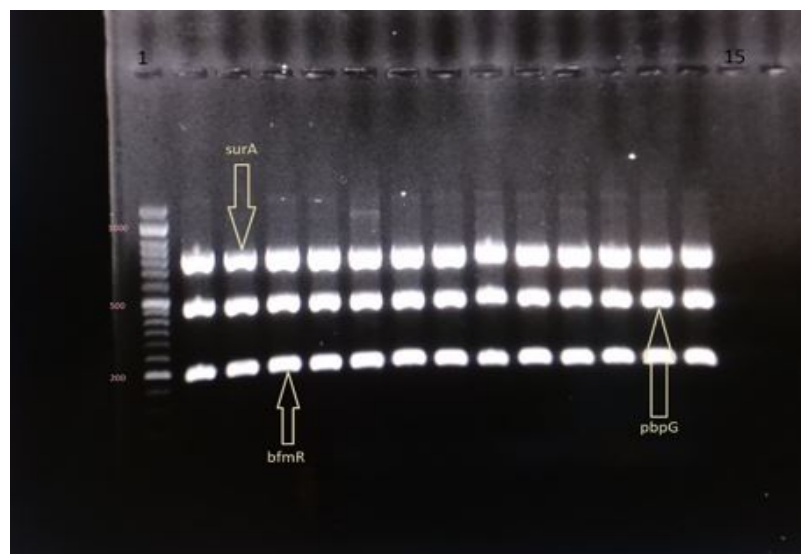
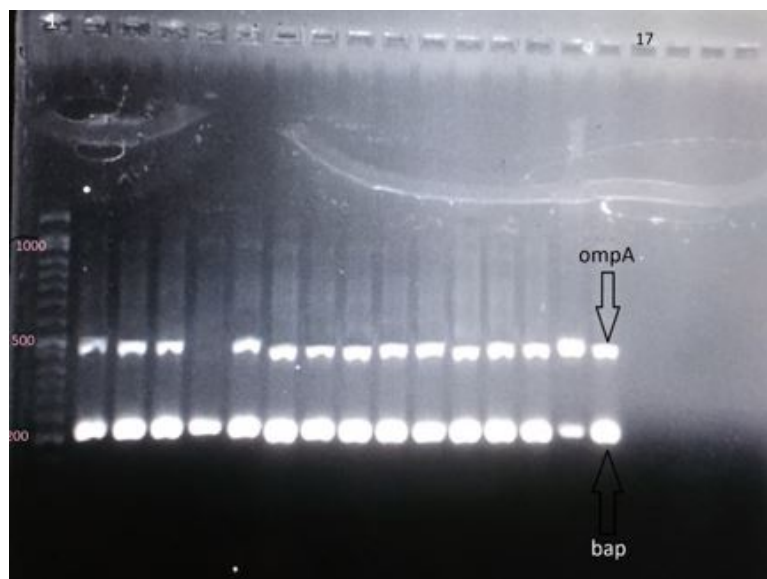
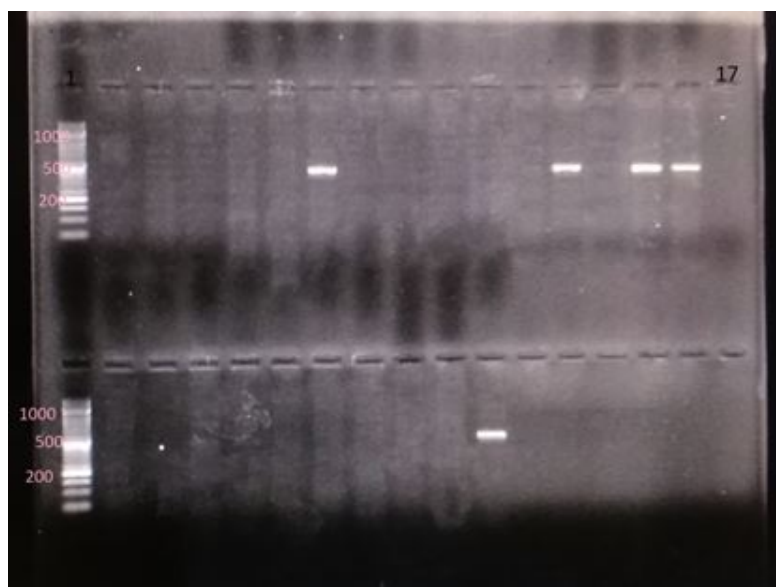


Figure 3. Electrophoresis gel of the PCR products of genes *surA* (the segment of 822 base pair), *pbpG* (the segment of 467 base pair), *bfmR* (the segment of 194 base pair); column 1: DNA marker of 1000 base pair; column 15: negative control



**Figure 4.** Electrophoresis gel of the PCR products of genes *ompA* (the segment of 490 base pair), *bap* (the segment of 223 base pair); column 1: DNA marker of 1000 base pair; column 17: negative control



**Figure 5.** Electrophoresis gel of the PCR products of genes *espA* (the segment of 392 base pair); column 1: DNA marker of 1000 base pair; column 17: negative control

**Table 2.** Pattern of pathogen factors in *A. baumannii* isolates isolated from the respiratory system

<i>ompA</i>	<i>bap</i>	<i>espA</i>	<i>basD</i>	<i>plD</i>	<i>bfmR</i>	<i>surA</i>	<i>CsuA</i>	<i>pbpG</i>	Pattern	Percentage	Number of isolates
+	+	-	+	+	+	+	+	+	P1	82%	41
-	-	-	+	+	+	+	+	+	P2	2%	1
+	+	-	-	-	+	-	+	+	P3	2%	1
+	+	+	+	+	+	+	+	+	P4	8%	4
+	+	+	+	+	+	+	-	+	P5	2%	1
+	+	-	-	+	+	+	+	+	P6	2%	1
-	+	-	+	+	+	+	+	+	P7	2%	1

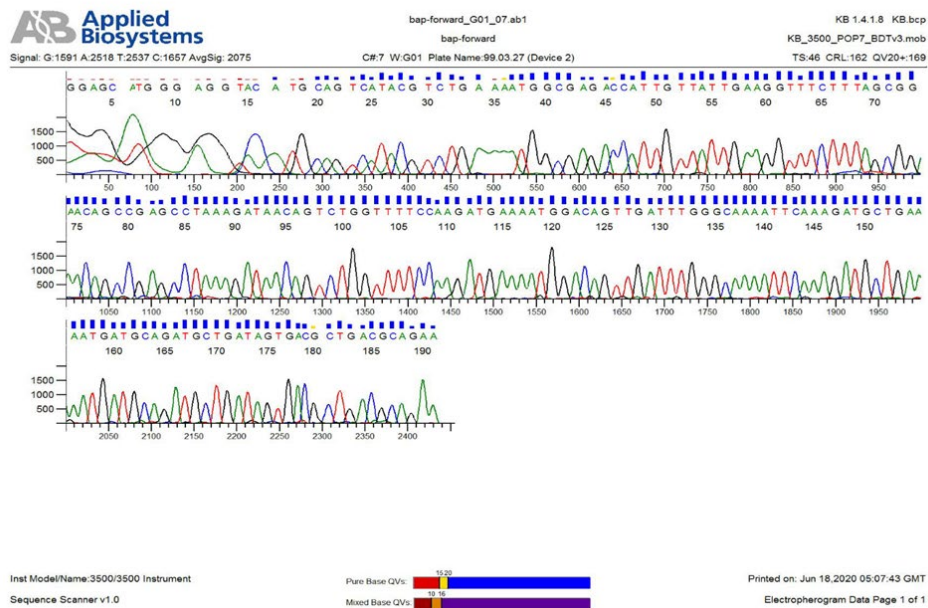


Figure 6. A sample of *bap* gene sequencing

## Discussion

During the last decade, *A. baumannii* has been identified as the most important nosocomial pathogen throughout the world. It is partly due to the living ability of this microorganism in the hospital environment and obtaining resistance mechanism leading to acute infections, especially in severely ill patients. Although extensive information exists concerning the mechanisms of antibiotic resistance in this microorganism, it cannot be stopped yet [11].

Although the severity of *A. baumannii* infection is directly related to the pathogen factors, the frequency of these factors in clinical samples of *A. baumannii* is less reported [12]. Therefore, the infection caused by this agent and the immune response of the host to these infections is still ambiguous. In the present study, the frequency of nine genes of virulence factors were evaluated in the clinical samples of *A. baumannii* isolated from the respiratory system of patients. Biofilm is considered as an important factor in clinical specimens of *A. baumannii*. The extension and thickness of biofilm structures and intracellular attachments are tightly related to *bap* family proteins, which are coded by the *bap* gene [13, 14].

Our results concerning the frequency of pathogen genes were highly similar to the findings of Chaoliu *et al.* in China. In the mentioned investigation, the frequency of the *bap* gene in the clinical samples of *A. baumannii* was reported as 87.5%. Furthermore, Fallah *et al.* in 2019 found the frequency of 92% in 100 clinical isolates in Iran [15, 16].

The *ompA* is a protein of the outer membrane that induces biofilm formation on the epithelial cells of

humans. This protein is coded by *ompA* [5]. In Iran, Bardbari *et al.* (2017) and Zeighami *et al.* (2019) reported the frequency percentage of this gene as 100% in clinical isolates of *A. baumannii* isolated from respiratory samples and 81% in the isolates related to other clinical specimens, respectively [17, 18]. Their results were highly similar to the findings of the current investigation (96%). Although the *ompA* gene has a high frequency, previous studies have shown that biofilm formation is more associated with the *bap* gene, compared to the *ompA* gene [19].

The *csuA* gene belongs to the *csu* gene operon, which consists of six genes (*csuA/BABCDs*) and codes the chaperone-usher secretory system as a very important part of pilli generation and biofilm structure formation on non-living surfaces [20]. The *bfmR* gene as the regulatory part of the two-component regulating system had a frequency of 100%. The presence of this gene in *A. baumannii* isolates is essential for pilli generation and biofilm formation on plastic surfaces [6]. Thummeepak *et al.* in a study in Thailand (2016) on *A. baumannii* clinical samples reported a frequency of 84% for the latter gene [5]. These findings revealed that most of the clinical isolates of *A. baumannii* had the potential for biofilm forming. The frequency of the *espA* gene in the present study (10%) was lower than the other genes that contribute to biofilm formation, including *csu*, *bfmR*, *espA*, *ompA*, and *bap*.

Thummeepak *et al.* and Kim *et al.* (2019) observed the frequencies of 30% and 50% for the mentioned gene in 255 clinical samples and 181 specimens

isolated from blood culture in South Korea, respectively [5, 21]. Two other genes investigated in the current study were *pID* and *surA*, both of which are serum resistance factors [7, 22]. Chaoliu *et al.* reported the frequency of 95% for *surA* and 92% for *pID*, which is consistent with our results [15].

The *basD* was another gene with a frequency of 96% in the current study. Chaloliu *et al.* and Kim *et al.* revealed it to be 92% and 98%, respectively [15, 21]. Finally, the *pbpG* gene that codes PBPs had a frequency of 100% in *A. baumannii* isolates. Although PBPs are the receptors of beta-lactam antibiotics, are known as one of the pathogen factors in *A. baumannii* isolates and account for bacterial survival in human serum and the soft tissues of animal models [20].

The findings of some investigations had a very low similarity with our results. The latter discrepancy could be attributed to the type of studied samples, study time, and the type of used antibiotic disk. On the other hand, these bacteria benefit from diverse mechanisms for pathogenicity, escape host immune system, and antibiotic resistance. Numerous studies have been performed in Iran on the epidemiologic characteristics and drug resistance pattern of *A. baumannii* isolates. However, it is necessary to consider the role of this bacterium as a potentially dangerous factor in nosocomial infections.

## Conclusion

The genes involved in the pathogenicity of *A. baumannii* have a high frequency and the nosocomial prevalence of this bacterium has elevated. Therefore, large-scale studies and protection programs, such as infection control in the ICU seem to be necessary. Limiting the consumption of antibiotics, development and changing of hygiene plans for contaminated facilities, and classifying patients in whom this bacterium has colonized are among the beneficial approaches for controlling the spread of *A. baumannii*.

## Acknowledgment

The present paper is related to the Master thesis of the first author.

## Financial Support

The current study has financially been supported by the Research Deputy of Iran University of Medical Sciences with the grant code of 98-4-4-16126. The authors would like to thank the latter deputy.

## Conflict of Interest

The authors declared no conflict of interest.



## شیوع ژن‌های مرتبط با فاکتور ویروانس و بیوفیلیم در اسینتوباکتر بومانی جدا شده از نمونه تنفسی بیماران بستری در بیمارستان امام خمینی تهران، ایران در سال ۱۳۹۷

هانیه مظفری<sup>۱</sup>، شیوا میرکلانتری<sup>۱</sup>، بهروز صادقی کلانی<sup>۱</sup>، نور امیرمظفری<sup>۱\*</sup>

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران، تهران، ایران.

### چکیده

### اطلاعات مقاله

**زمینه و اهداف:** اسینتوباکتر بومانی یک کوکوباسیل گرم منفی است که در طبیعت انتشار وسیعی داشته و به عنوان یکی از عوامل مهم عفونت‌های بیمارستانی محسوب می‌شود. به واسطه ایجاد مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در این باکتری، درمان موفقیت‌آمیز بیماران با مشکلات فراوانی روبرو و در پی آن منجر به مرگ و میر آن‌ها شده است. مطالعه حاضر برای بررسی ۹ ژن بیماری‌زایی در نمونه‌های بالینی اسینتوباکتر بومانی جدا شده از بیماران طراحی و انجام گردید.

**مواد و روش کار:** در این مطالعه تعداد ۵۰ نمونه اسینتوباکتر بومانی ذخیره شده در مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های دانشگاه علوم پزشکی ایران که جدا شده از دستگاه تنفسی بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان امام خمینی، تهران، ایران بودند، انتخاب شدند و با روش‌های میکروبیولوژی و بیوشیمیایی تایید گردیدند. پس از تایید سویه‌ها، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، برای ژن‌های (*basD*, *plD*, *csuA*) و ژن‌های (*surA*, *pbpG*, *bfmR*) و ژن‌های (*bab*, *ompA*) آزمون Multiplex PCR انجام شد. ژن *espA* به صورت جداگانه با PCR معمولی ارزیابی شد. نتایج به دست آمده از PCR در نهایت برای تعیین توالی دوطرفه به شرکت پیشگام ارسال شد.

**یافته‌ها:** از بین ۵۰ نمونه بالینی اسینتوباکتر بومانی، نتایج حاصل از Multiplex PCR نشان داد که به ترتیب فراوانی دو ژن *pbpG* و *bfmR* (۱۰۰٪) و ۵۰٪ فراوانی ژن‌های *bab* و *surA*, *plD* و *csuA* (۹۸٪) و ۴۹٪ فراوانی ژن‌های *basD* و *ompA* (۹۶٪) و همچنین ژن *espA* (۱۰٪) مشاهده شد.

**نتیجه‌گیری:** شیوع فاکتورهای بیماری‌زایی در جدایه‌های اسینتوباکتر بومانی، بیشتر از ۹۰٪ بود. به خصوص در مورد ژن‌های دخیل در تشکیل بیوفیلیم، می‌توان نتیجه گرفت که اکثر سویه‌های مورد مطالعه، توانایی بالایی برای تشکیل ساختارهای بیوفیلیم دارند. افزایش میزان شیوع بیمارستانی اسینتوباکتر بومانی، لزوم طراحی برنامه‌های حفاظتی نظیر کنترل عفونت‌های ایجاد شده در بخش مراقبت‌های ویژه را خاطر نشان 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 را تجویز نمود.

**کلید واژه‌ها:** اسینتوباکتر بومانی، ژن‌های بیماری‌زایی، عفونت‌های تنفسی

کپی‌رایت © مجله میکروبیولوژی پزشکی ایران: دسترسی آزاد، کپی برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

تاریخچه مقاله  
دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۱۵  
پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۲۵  
انتشار آنلاین: ۱۴۰۰/۰۴/۰۷  
موضوع: باکتری‌شناسی پزشکی

### نویسنده مسئول:

دکتر نور امیر مظفری، گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران، تهران، ایران

ایمیل:

[amirmozafari@iums.ac.ir](mailto:amirmozafari@iums.ac.ir)

### مقدمه

دارند [۳]. اسینتوباکتر بومانی به دلیل مقاومت آنتی‌بیوتیک یکی از مشکلات مطرح در عفونت‌های بیمارستانی در سراسر دنیا محسوب می‌شود. اهمیت بالینی این باکتری به ویژه در طی ۱۱ سال اخیر با توانایی کسب ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی، درمان را با تهدید جدی مواجه ساخته است [۴].

این پاتوژن با استفاده از ژن *bab* پروتئین (Biofilm-) Bap (associated protein) را تولید کرده که این فاکتور پس از اتصال اسینتوباکتر بومانی بر روی سطوح سلولی تشکیل بیوفیلیم را آغاز می‌کند. پروتئین OmpA (Outer membrane protein A) توسط ژن *ompA* بیان شده و ادهیزنی است که باعث ایجاد بیوفیلیم در

اسینتوباکتر بومانی یک کوکوباسیل گرم منفی غیر تخمیری هوازی و متعلق به خانواده موراکسلایه است. این باکتری به طور معمول از محیط بیمارستان و بیماران بستری در بیمارستان جدا شده و جزو پاتوژن‌های فرصت طلب است. اسینتوباکترها، به ویژه اسینتوباکتر بومانی جزء فلور طبیعی پوست بوده و می‌توانند در حفره دهان، حلق و لوزه مستقر شود که این مسئله خود از لحاظ اپیدمیولوژی و عفونت‌های بیمارستانی حایز اهمیت است [۱].

برخی از مهمترین عفونت‌های ناشی از این باکتری، اندوکاردیت، مننژیت، پنومونی، باکتری می و عفونت ادراری هستند [۲]. بیش از ۴۳٪ افراد سالم، این ارگانیسم را در سطح بدن خود



## مواد و روش‌ها

### جداسازی و تعیین سویه‌ها

در این پژوهش ۵۰ جدایه /اسینتوباکتر بومانی ذخیره شده در مرکز کلکسیون میکروارگانسیم‌های دانشگاه علوم پزشکی ایران به صورت تصادفی انتخاب شدند. این باکتری‌ها از نمونه‌های بالینی جدا شده از دستگاه تنفسی بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان امام خمینی، تهران در سال ۱۳۹۷ انتخاب شدند [۹]. به منظور حصول اطمینان از صحت انتخاب کلونی‌ها، تست‌های بیوشیمیایی (اکسیداز، کاتالاز، OF بی‌هوازی، OF هوازی، TSI، اندول (SIM)، حرکت (SIM)، سیمون سیترات، VP، MR، مک کانکی، لاکتوز) (شرکت مرک آلمان) انجام شد. به این ترتیب ۵۰ ایزوله /اسینتوباکتر بومانی شناسایی و تایید شدند [۱۰].

### طراحی پرایمرها

سایت‌های هدف انتخاب شده برای پرایمرهای /اسینتوباکتر بومانی، ۹ ژن بیماری‌زایی شامل *bap* /*ompA* /*plD* /*basD* /*espA* /*bfmR* /*surA* /*pbpG* /*csuA* تعیین شد. پس از انتخاب سایت هدف برای طراحی پرایمر بانک‌های اطلاعاتی مربوط به هر باکتری از سایت NCBI جستجو و تهیه گردید. برای ارزیابی دمای *Anneling* و *Tm* پرایمرهای طراحی شده از نرم‌افزار *Oligo2* و *Oligoanalyzer* و *Gene Runner* استفاده شد (جدول ۱). بعد از طراحی پرایمرهای ذکر شده به منظور اطمینان از اختصاصی بودن عملکرد آنها، در بانک اطلاعاتی NCBI عمل *Blast* کردن با نمونه‌های انسانی، قارچی، ویروس‌ها و میکروارگانسیم‌های دیگر صورت پذیرفت.

سطح سلول‌های اپی تلیال می‌گردد. *Esp* (exopolysaccharide) که توسط ژن *espA* کد می‌شود و سطح سلول افزایش یافته، باعث محافظت سلول از آسیب‌های محیطی می‌شود. پروتئین *Esp* در تجمع و تشکیل بیوفیلم باکتری نقش دارد، در مطالعه Thummeepak و همکاران در سال ۲۰۱۶ در ۲۵۵ نمونه بالینی *ompA* ۸۴/۴ درصد، *bap* ۴۸ درصد، *espA* ۳۰/۲ درصد گزارش گردید [۵].

پروتئین *Csu* سیستم ترشحی شامل چاپرون و آشر تولید می‌کند که برای مونتاژ پیل و تشکیل بیوفیلم روی سطح نقش دارد. بیان این پروتئین تحت کنترل سیستم تنظیمی دو جزئی *Bfms/BfmR* است که شامل یک سنسور کیناز کدشده به وسیله *bfmS* و یک تنظیم‌کننده پاسخ کدشده به وسیله *bfmR* است. از این سیستم برای تشکیل بیوفیلم باکتری روی سطوح پلی‌استیرین استفاده می‌شود. در مطالعات قبلی نشان داده شده است که غیر فعال کردن ژن *bfmR* باعث از دست رفتن تولید پیل، توانایی اتصال و تشکیل بیوفیلم بر روی سطح پلاستیک می‌شود. فراوانی این ژن در سویه‌های بالینی، بالا گزارش شده است. فراوانی این ژن در مطالعه Thummeepak و همکاران ۸۴٪ گزارش شده است [۶]. از فاکتورهای بیماری‌زای دیگر، می‌توان به (Iron acquisition system) *slpD* *basD* (phospholipase D) *surA* (surface antigen) ، *pbpG* protein A (penicillin binding protein G) که بیان‌کننده مقاومت بتالاکتامازی است اشاره کرد [۷، ۸]. بنابراین، هدف از انجام این مطالعه شناسایی ۹ ژن ویروانس مختلف در ایزوله‌های /اسینتوباکتر بومانی جدا شده از بیماران مبتلا به پنومونی و بستری در بخش ICU بیمارستان امام خمینی بررسی شد.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی ژن‌های بیماری‌زایی در سویه‌های /اسینتوباکتر بومانی

Gene	Primer Sequence	Product Size	Reference
<i>OmpA</i>	F: GCTGGTGTGGTGGCTTTCTG R: TCGGTTGATCCCAAGCGAAA	490	This study
<i>Bap</i>	F: TGAAAGTGGCTGCCAGTGAT R: TCTGCGTCAGCGTCACTATC	223	This study
<i>EspA</i>	F: CAGCTTTAGGTCTTGCGGGA R: TGCTAAACCGAAGTCGCCAA	392	This study
<i>PbpG</i>	F: TGGATGCGCAAACAGGTGAA R: GGTCGGTGTGGTTGAGAACT	467	This study
<i>BasD</i>	F: TGCTGTTCTGTTCTTTGGCG R: GTTGTGTTGAGCGCCGATG	517	This study
<i>plD</i>	F: GCTGTGGCTTTGACAGGTTG R: TAGCGCAAACGGTGTGTTG	695	This study
<i>BfmR</i>	F: ACCGATGGTAACCGTGCAAT R: TCTGCACCCATTTCCAGACC	194	This study
<i>SurA</i>	F: GATGCGATTGCACCTGGAAC R: TTGACGTGCCATACGCTCTT	822	This study
<i>CsuA</i>	F: TGGTGAAGCTACCACAGGTT R: ACGACTACCATCATGGGCTG	322	This study

## استخراج DNA از ایزوله‌های اسینتوباکتر بومانی

ابتدا مقداری از کلنی‌های هر یک از سویه‌های جدا شده اسینتوباکتر بومانی به‌طور جداگانه در یک میکروتیوب حاوی ۲ میلی‌لیتر محیط TSB کشت داده شد و در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت یک شبانه روز انکوبه گردید. بعد از گذشت مدت زمان انکوباسیون، DNA ژنومیک به روش جوشاندن از کلنی‌ها استخراج شد. روش استخراج به این ترتیب انجام شد که ابتدا بعد از گذشت ۲۴ ساعت از انکوباسیون، سوسپانسیون باکتری به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از مایع رویی رسوب دور ریخته شد و مقدار ۱ میلی‌لیتر آب مقطر به رسوب باکتری اضافه گردید. این عمل به همین شکل ۲ مرتبه دیگر تکرار شد. بعد از طی این مراحل، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر بافر استریل TE (pH 8) به رسوب باکتری اضافه شد. سپس میکروتیوب‌های حاوی رسوب باکتری و بافر TE، ابتدا به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰ درجه سلسیوس جوشانده شد و بلافاصله به مدت ۵ دقیقه به دمای (۲۰-) درجه انتقال یافت. این عمل جوشاندن و سرد کردن ۳ مرتبه تکرار شد. سپس میکروتیوب‌های حاوی رسوب باکتری برای بار آخر در دور ۱۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. در انتها محلول رویی که حاوی DNA ژنومیک است برای PCR در یک میکروتیوب استریل جمع‌آوری شد. برای تعیین میزان خلوص DNA استخراج‌شده، الکتروفورزیس و بیوفتومتر انجام گردید.

## انتخاب ژن‌های بیماری‌زایی در ایزوله‌های اسینتوباکتر

### بومانی و انجام مولتی پلکس PCR

PCR به‌وسیله تگ مسترمیکس (Amplicon) انجام شد که حاوی Taq polymerase, dNTPs, MgCl<sub>2</sub> و بافر است. حجم نهایی هر واکنش برای انجام Multiplex PCR برابر ۲۵ میکرولیتر تهیه گردید که حاوی مقدار ۱۲ میکرولیتر مستر میکس برای تمام واکنش‌ها بود. همچنین مقدار ۰/۳ میکرولیتر به غلظت ۱۰ پیکومولار از هر یک از پرایمرهای فوروارد و ریورز برای ژن *ompA* و ۱ میکرولیتر از هر دو پرایمر برای ژن *bap* داخل یک میکروتیوب ریخته شد. داخل یک میکروتیوب دیگر مقدار ۰/۵ میکرولیتر از هر دو پرایمر ریورز و فوروارد برای ۳ ژن *basD*, *plD*, *csuA* ریخته شد. داخل سومین میکروتیوب مقادیر ۱، ۰/۵ و ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای ریورز و فوروارد به ترتیب برای ژن‌های *pbpG*, *surA*, *bfmR* ریخته شد. برای ژن *espA* نیز مقدار ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها به‌طور جداگانه در یک میکروتیوب ریخته شد. ژن *espA* به تنهایی و نه به شکل مولتی پلکس بررسی شد. غلظت نهایی برای هر پرایمر ۱۰۰ میکرومول بود. در ادامه

مقدار ۱ میکرولیتر DNA با غلظت ۲۰۰ ng/L و ۱ میکرولیتر آب مقطر ۲ بار تقطیر عاری از هر گونه نوکلئاز برای رسیدن به حجم نهایی به هر واکنش اضافه شد. در پایان فرایند Multiplex PCR به این ترتیب انجام شد: (۱) دناتوراسیون اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس، (۲) دناتوراسیون ۳۴ چرخه در دمای ۹۵ درجه به مدت ۴۰ ثانیه، (۳) آنلینگ (دمای آنلینگ برای هر ۹ ژن ۵۹ درجه تعیین شد) به مدت ۴۵ ثانیه، (۴) پلیمریزاسیون به مدت ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه، (۵) پلیمریزاسیون نهایی در ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه. در نهایت روی محصولات PCR الکتروفورز در ۱٪ ژل آگاروز حاوی Safe stain انجام گرفت و توسط gel documentation مشاهده شد. نتایج به‌دست‌آمده از PCR در نهایت برای تعیین توالی دوطرفه به شرکت پیشگام ارسال شد.

## تجزیه و تحلیل آماری

آنالیز آماری به کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ (SPSS Inc., Chicago, IL., USA) و رابطه بین مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فراوانی ژن‌های *pbpG*/*csuA*/*ompA*/*bap*/*bfmR*/*espA*/*basD*/*plD* با آزمون آماری T-test بررسی گردید.

## یافته‌ها

### شناسایی اسینتوباکتر بومانی

به‌منظور تعیین قطعی ۵۰ سویه اسینتوباکتر بومانی جدا شده از دستگاه تنفسی بیماران، تست‌های میکروبی شناسی و بیوشیمیایی انجام گردید. در آزمایشگاه هر ۵۰ سویه روی محیط های مک کانکی آگار و بلاد آگار کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد. پس از ۲۴ ساعت، با آزمایش مستقیم (رنگ آمیزی گرم) وجود کوکوباسیل‌های گرم منفی اسینتوباکتر به روش میکروسکوپی تایید شد. سپس، برای تشخیص گونه‌های مختلف اسینتوباکتر تست‌های بیوشیمیایی IMVIC، اوره‌آز، SIM، VP، MR، OF، TSI، کاتالاز و اکسیداز و رشد در ۳۷ و ۴۲ درجه سلسیوس انجام شد. بررسی نتایج حاصل از بررسی تست میکروبی شناسی و بیوشیمیایی نشان داد که ایزوله‌هایی که دارای واکنش لاکتوز منفی، غیر متحرک، اکسیداز منفی، کاتالاز مثبت، اندول منفی، پیگمان منفی، اوره‌آز مثبت، سیترات مثبت، H<sub>2</sub>S منفی، MR منفی و VP منفی بودند، (هر ۵۰ نمونه)، به‌عنوان اسینتوباکتر بومانی تایید شدند و در منفی ۷۰ درجه سلسیوس در محیط پپتون واتر حاوی ۳۰ درصد گلیسرول، نگهداری شد.

و برابر ۹۸٪ بود. تنها یک ایزوله فاقد ژن مذکور بود. در صد فراوانی ژن‌های دیگری که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند شامل ژن *plD* (۹۸٪)، ژن *basD* (۹۶٪)، ژن *surA* (۹۸٪) و ژن (۱۰۰٪) *pbpG* بودند ( $P < 0.05$ ). (شکل ۵-۱). برای تمامی نمونه‌های منفی، ۲ بار تست PCR به صورت تک ژنی تکرار گردید. فراوانی ژن‌های *surA /pbpG /csuA /ompA /bap /bfmR /basD /plD* در تمام نمونه‌ها به میزان (۸۲٪/۴۱) مشاهده شد (جدول ۲).

نتایج به‌دست‌آمده از PCR در نهایت برای تعیین توالی دوطرفه به شرکت پیشگام ارسال شد. نتایج حاصل از سکانس بررسی و میزان شباهت بالای ۸۰٪ در ایزوله‌ها مشاهده شد ( $P < 0.05$ ) (شکل ۶).

### نتایج PCR برای بررسی وجود ژن‌های بیماری‌زا

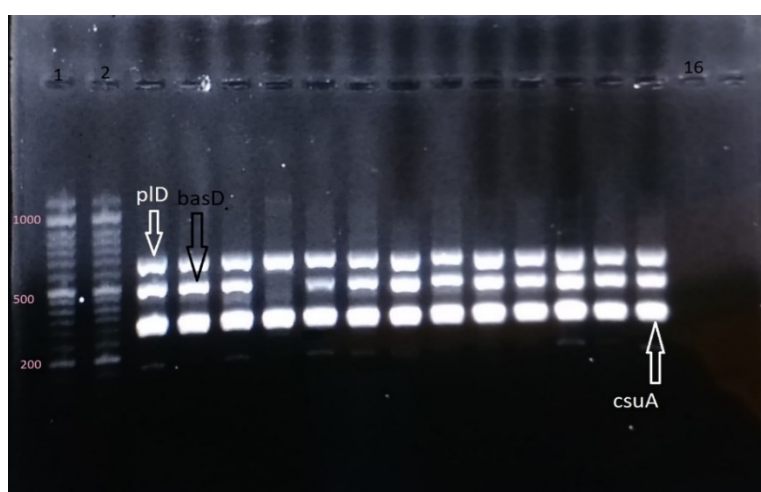
تمام نمونه‌هایی که در روش بیوشیمیایی / سینتوباکتر بومانی تشخیص داده شدند از نظر دارا بودن ژن‌های *ompA /bap /bfmR* تشخیص داده شدند. نتایج حاصل از Multiplex PCR قرار گرفتند. نتایج حاصل از Multiplex PCR نشان داد که ژن‌های دخیل در تشکیل بیوفیلم با فراوانی *ompA* (۹۶٪)، *basD* (۹۶٪)، *bap* (۹۸٪)، *bfmR* (۱۰۰٪) در این مطالعه مشاهده شد، ژن *espA* با کمترین فراوانی (۱۰٪) در بین ایزوله‌ها مشاهده شد. طول محصولات در جدول ۱ اشاره شده است.

طبق نتایج مطالعات قبلی، ژن *bap* موثرترین ژن برای تشکیل بیوفیلم است [۵]. فراوانی این ژن در این مطالعه بسیار بالا

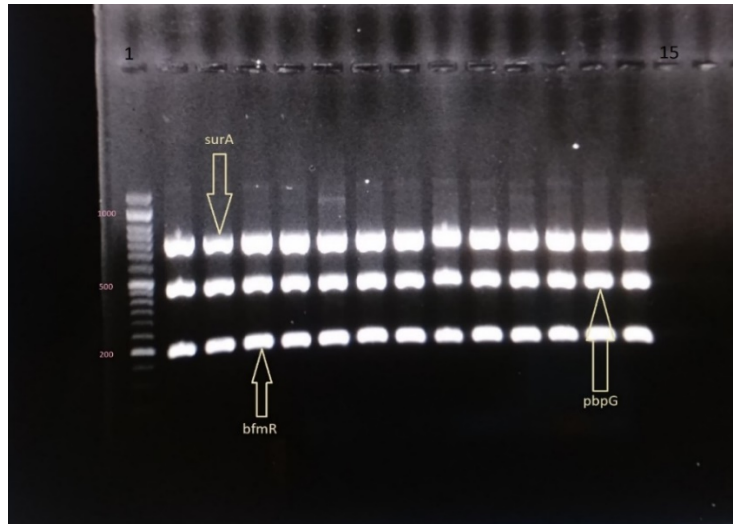


ژن‌های مورد بررسی

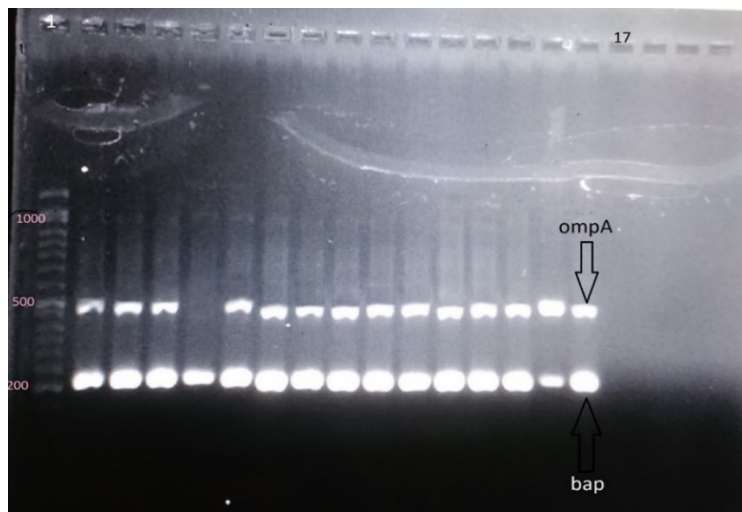
شکل ۱. درصد فراوانی ژن‌های پاتوژن مورد مطالعه در / سینتوباکتر بومانی‌های ایزوله‌شده در بیماران



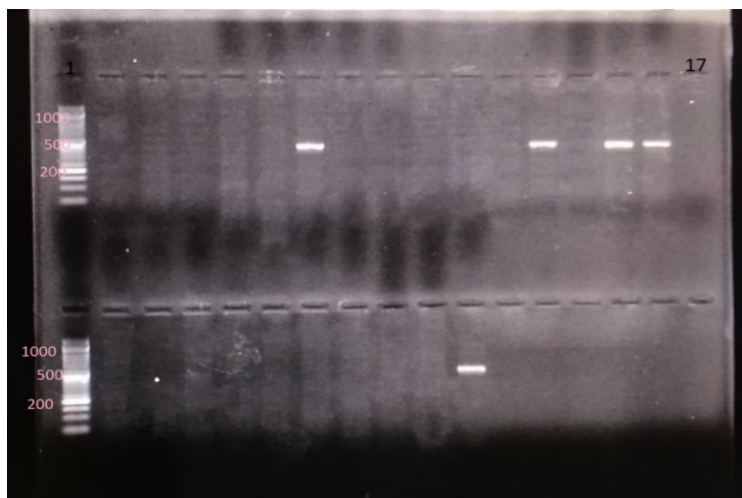
شکل ۲. ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ژن‌های *plD* (قطعه ۶۹۵ جفت بازی)، *basD* (قطعه ۵۱۷ جفت بازی)، *csuA* (قطعه ۳۲۲ جفت بازی)، ستون ۱۰۲: (مارکر ۱۰۰۰ جفت بازی DNA)، ستون ۱۶: کنترل منفی



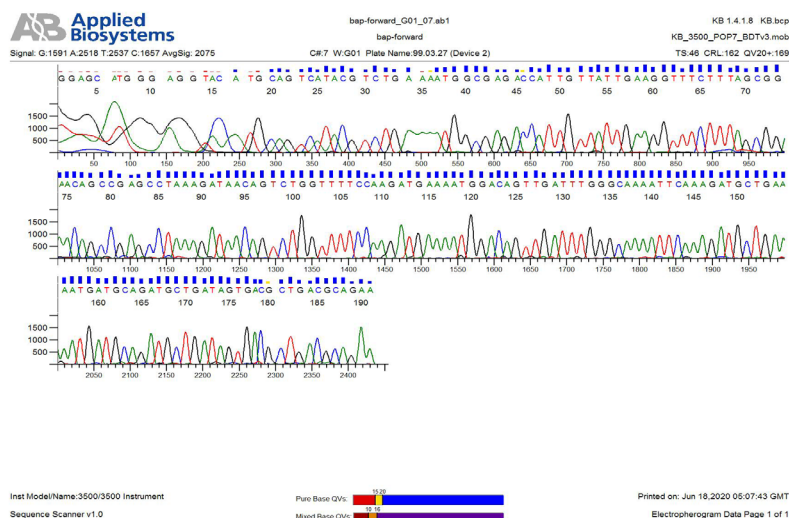
شکل ۳. ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ژن‌های *surA* (قطعه ۸۲۲ جفت بازی)، *pbpG* (قطعه ۴۶۷ جفت بازی)، *bfmR* (قطعه ۱۹۴ جفت بازی)، ستون ۱: (مارکر ۱۰۰۰ جفت بازی DNA)، ستون ۱۵: کنترل منفی



شکل ۴. ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ژن‌های *ompA* (قطعه ۴۹۰ جفت بازی)، *bap* (قطعه ۲۲۳ جفت بازی) ستون ۱: (مارکر ۱۰۰۰ جفت بازی DNA)، ستون ۱۷: کنترل منفی



شکل ۵. ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ژن *espA* (قطعه ۳۹۲ جفت بازی)، ستون ۱: (مارکر ۱۰۰۰ جفت بازی DNA)، ستون ۱۷: کنترل منفی



شکل ۶. نمونه‌ای از تعیین توالی ژن *bap*

جدول ۲. الگوی فاکتورهای بیماری‌زا در سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* جدا شده از دستگاه تنفسی

<i>ompA</i>	<i>bap</i>	<i>espA</i>	<i>basD</i>	<i>pID</i>	<i>bfmR</i>	<i>surA</i>	<i>CsuA</i>	<i>pbpG</i>	Pattern	Percentage	Number of isolates
+	+	-	+	+	+	+	+	+	P1	٪۸۲	۴۱
-	-	-	+	+	+	+	+	+	P2	٪۲	۱
+	+	-	-	-	+	-	+	+	P3	٪۲	۱
+	+	+	+	+	+	+	+	+	P4	٪۸	۴
+	+	+	+	+	+	+	-	+	P5	٪۲	۱
+	+	-	-	+	+	+	+	+	P6	٪۲	۱
-	+	-	+	+	+	+	+	+	P7	٪۲	۱

## بحث

*اسینتوباکتر بومانی* جدا شده از سیستم تنفسی بیماران را بررسی کردیم. بیوفیلم به‌عنوان یک فاکتور بیماری‌زایی مهم در نمونه‌های بالینی *اسینتوباکتر بومانی* مطرح است. گسترش و ضخامت ساختارهای بیوفیلم و اتصالات داخل سلولی ارتباط تنگاتنگ با پروتئین‌های خانواده *bap* دارد که توسط ژن *bap* کد می‌شوند [۱۳، ۱۴]. نتایج حاصل از درصد فراوانی ژن‌های مطالعه‌شده 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. همچنین در مطالعه Fallah و همکاران در سال ۲۰۱۷، روی ۱۰۰ ایزوله بالینی در ایران فراوانی این ژن ۹۲٪ گزارش شد [۱۵، ۱۶].

*ompA* یک پروتئین غشای خارجی است که القاکنده بیوفیلم روی سلول‌های اپیتلیال انسانی است. این پروتئین توسط ژن *ompA* کد می‌شود [۵]. در ۲ مطالعه جداگانه در ایران که

در طی دهه گذشته، حضور *اسینتوباکتر بومانی* به‌عنوان مهم‌ترین عامل بیماری‌زای بیمارستانی در سراسر دنیا شناخته شد. بخشی از این رخداد، مربوط به توانایی بقای این میکروارگانیسم در محیط‌های بیمارستانی و کسب مکانیسم مقاومت و ایجاد عفونت‌های حاد، به‌ویژه در بیماران بدحال است. اگرچه اطلاعات زیادی در مورد مکانیسم‌های مسئول مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این میکروارگانیسم موجود است، ولی همچنان قادر به متوقف کردن آن نیستند [۱۱]. شدت عفونت‌زایی *اسینتوباکتر بومانی* ارتباط مستقیمی با فاکتورهای بیماری‌زایی آن دارد. با این حال میزان فراوانی فاکتورهای بیماری‌زایی در نمونه‌های کلینیکی *اسینتوباکتر بومانی* کمتر گزارش می‌شود [۱۲]. در نتیجه چگونگی عفونت‌زایی و نیز پاسخ سیستم ایمنی میزبان نسبت به این عفونت‌ها، همچنان در حال ای از ابهام فرو مانده است. در این مطالعه، فراوانی تعداد ۹ عدد از ژن‌های فاکتورهای بیماری‌زایی در نمونه‌های بالینی

هستند، جزو فاکتورهای بیماری‌زایی در سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* به حساب می‌آیند و عامل بقای باکتری در سرم انسانی و همچنین در بافت‌های نرم مدل‌های حیوانی محسوب می‌شوند [۲۰]. در برخی از مطالعات شباهت داده‌ها با نتایج این مطالعه بسیار پایین بود، عدم تطابق می‌تواند به دلیل نوع نمونه‌های مورد بررسی، زمان مطالعه و نوع دیسک آنتی‌بیوتیک مصرفی باشد. از طرفی این باکتری‌ها از مکانسیم‌های مختلفی برای پایداری پاتوژنسیته، فرار از سیستم ایمنی میزبان و همچنین مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها بهره می‌برند. با این که در کشور ما مطالعات زیادی در رابطه با ویژگی‌های اپیدمیولوژیک و الگوی مقاومت دارویی ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی* انجام گرفته است، هنوز توجه به نقش این باکتری به‌عنوان یک عامل بالقوه خطرناک در عفونت‌های بیمارستانی ضروری به نظر می‌رسد.

### نتیجه‌گیری

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 نتیجه پایان‌نامه کارشناسی ارشد نویسنده اول است.

### تعارض در منافع

هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

### منابع مالی

هزینه مالی این تحقیق به‌وسیله معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایران طبق طرح مصوب شماره (۹۸-۴-۴-۱۶۱۲۶) تامین گردیده است.

توسط Bardbari و همکاران در سال ۲۰۱۷ و Zeighami و همکاران در سال ۲۰۱۹ انجام گردید، در صد 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 Zeighami و همکاران، گزارش شده است که شباهت بالایی (۹۶٪) با مطالعه حاضر داشتند [۱۷، ۱۸]. اگرچه ژن *ompA* فراوانی بالایی دارد، ولی بر اساس مطالعات پیشین ایجاد ساختارهای بیوفیلیم با ژن *bap* در مقایسه با ژن *ompA* ارتباط موثرتری دارد [۱۹].

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 پیل و تشکیل ساختارهای بیوفیلیم روی سطوح غیر جاندار بسیار مهم است [۲۰]. ژن *bfmR* که جزو تنظیمی سیستم تنظیم‌کننده دو جزئی است فراوانی ۱۰۰٪ داشت. وجود این ژن در ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی* در تولید پیل و تشکیل ساختارهای بیوفیلیم روی سطوح پلاستیکی بسیار ضروری است [۶]. در مطالعه Thummeepak و همکاران که در تایلند (۲۰۱۶) بر روی ۲۵۵ نمونه بالینی *اسینتوباکتر بومانی* انجام شد فراوانی این ژن ۸۴٪ گزارش شده است [۵]. این یافته‌ها نشان دهنده این مهم هستند که بیشتر سویه‌های بالینی *اسینتوباکتر بومانی* جداشده، توانایی تشکیل بیوفیلیم را دارند. در بین ژن‌های موثر در تشکیل بیوفیلیم که شامل *csu*, *bfmR*, *espA*, *ompA*, *bap* است، فراوانی ژن *espA* در مطالعه ما نسبت به بقیه ژن‌ها کمتر بود (۱۰٪). در مطالعه Thummeepak که روی ۲۵۵ نمونه بالینی و مطالعه Kim و همکاران در کره جنوبی (۲۰۱۹) که روی ۱۸۱ نمونه جداشده از کشت خون انجام گرفت، فراوانی این ژن به ترتیب ۳۰٪ و ۵٪ گزارش گردیده است [۵، ۲۱]. دیگر ژن‌های بیماری‌زایی که در این پژوهش بررسی شدند، *surA* و *pld* هر دو فاکتور مقاومت به سرم هستند [۷، ۲۲]. فراوانی ژن *surA* و *pld* در مطالعه Liu و همکاران به ترتیب ۹۵٪ و ۹۲٪ بود که شباهت بالایی با مطالعه ما داشت [۱۵]. *basD* ژن دیگری است که در مطالعه ما ۹۶٪ فراوانی داشت. در مطالعه Liu و همکاران ۹۲٪ و در مطالعه Kim و همکاران ۹۸٪ گزارش شده است [۱۵، ۲۱]. در نهایت ژن *pbpG* که کدکننده PBPs است، در ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی* فراوانی ۱۰۰٪ داشت. اگر چه PBPs گیرنده آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام‌ها

## Referance

- Eliopoulos, G.M., L.L. Maragakis, and T.M. Perl, *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. *Clin Infect Dis*. 2008; 46(8): 1254-63. [DOI:10.1086/529198] [PMID]
- Jeon, B- C, Jeong SH, Bae IK, Kwon SB, Lee K, Young D, et al. Investigation of a nosocomial out-break of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23  $\beta$ -lactamase in Korea. *J Clin Microbiol*. 2005; 43(5): 2241-5 [DOI:10.1128/JCM.43.5.2241-2245.2005] [PMID] [PMCID]
- Villers D, Espaze E, Coste-Burel M, Giauffret F, Ninin E, Nicolas F, Richet H. Nosocomial *Acinetobacter baumannii* infections: microbiological and clinical epidemiology. *Ann Intern Med*. 1998; 129(3):182-9. [DOI:10.7326/0003-4819-129-3-199808010-00003] [PMID]
- Dijkshoorn, L., A. Nemeč, and H. Seifert, An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol*. 2007; 5(12): 939-51. [DOI:10.1038/nrmicro1789] [PMID]
- Thummeepak, R., Phattaraporn Kongthai, Udomluk Leungtongkam, Sutthirat Sitthisak. Distribution of virulence genes involved in biofilm formation in multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Int Microbiol*. 2016; 19(2): 121-9
- Cerqueira, G.M. and A.Y. Peleg, Insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenicity. *IUBMB life*. 2011; 63(12): 1055-60. [DOI:10.1002/iub.533] [PMID]
- Chang-Ro Lee, Jung Hun Lee, Moonhee Park, Kwang Seung Park, Il Kwon Bae, Young Bae Kim, et al., Biology of *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017; 7: p. 55. [DOI:10.3389/fcimb.2017.00055]
- Song, W.Y., Jeong D, Kim J, Lee MW, Oh MH, Kim HJ, et al., Key structural elements for cellular uptake of acinetobactin, a major siderophore of *Acinetobacter baumannii*. *Org Lett*. 2017; 19(3): 500-3 [DOI:10.1021/acs.orglett.6b03671] [PMID]
- Maryam R, Golnaz YZ, Mojgan O, Malihe T, Nour A. Identification of five phylogenetic groups of carbapenemase (bla OXA-23, 24, 51, 58,143) in *Acinetobacter baumannii* strains isolated from clinical samples in Iran by multiplex PCR. *Der Pharma Chemica*. 2015;7(7):11-6.
- Jane F. Turton, Neil Woodford, Judith Glover, Susannah Yarde, Mary E. Kaufmann, Tyrone L. Pitt, Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the blaOXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. *J Clin Microbiol*. 2006; 44(8): 2974-6. [DOI:10.1128/JCM.01021-06] [PMID] [PMCID]
- Chun-Chieh Tseng, Yun-Hsuan Tsai, Anren Hu, Je-Wen Liou, Kai-Chih Chang, Altered susceptibility to the bactericidal effect of photocatalytic oxidation by TiO<sub>2</sub> is related to colistin resistance development in *Acinetobacter baumannii*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016; 100(19): 8549-8561. [DOI:10.1007/s00253-016-7654-x] [PMID]
- Morris FC, Dexter C, Kostoulias X, Uddin MI, Peleg A, The mechanisms of disease caused by *Acinetobacter baumannii*. *Front Microbiol*. 2019; 10: 1601. [DOI:10.3389/fmicb.2019.01601] [PMID] [PMCID]
- Longo, F., C. Vuotto, and G. Donelli, Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. *New Microbiol*, 2014; 37(2):119-27.
- Yang C-H, Su P-W, Moi S-H, Chuang L-Y, Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: genotype-phenotype correlation. *Molecules*. 2019; 24(10): 1849. [DOI:10.3390/molecules24101849] [PMID] [PMCID]
- 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. [DOI:10.18632/oncotarget.24651] [PMID] [PMCID]
- 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
- 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. [DOI:10.1186/s12879-019-4272-0] [PMID] [PMCID]
- Bardbari A.M, 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. [DOI:10.1016/j.micpath.2017.04-.039] [PMID]
- alib 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.
- McConnell, M.J., L. Actis, and J. Pachón, *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]
- Yoon E-J, Kim D, Lee H, Lee HS, Shin JH, Uh Y, et al., Counter clinical prognoses of patients with bloodstream infections between causative *Acinetobacter baumannii* clones ST191 and ST451 belonging to the international clonal lineage II. *Front Public Health*. 2019; 7: 233. [DOI:10.3389/fpubh.2019.00233] [PMID] [PMCID]
- Jacobs, A.C., Hood I, Boyd KL, Olson PD, Morrison JM, Carson S, et al., Inactivation of phospholipase D diminishes *Acinetobacter baumannii* pathogenesis. *Infect Immun*. 2010; 78(5): 1952-62. [DOI:10.1128/IAI.00889-09] [PMID] [PMCID]