BRIEF REPORT

Molecular Study of Plasmid Genes Ampc of Acinetobacter baumannii Isolated from Clinical Cases Using Multiplex PCR

Sajad Fekri[1],
Mohammad Javad Soltani Banavandi[2],
Kumarss Amini[3]

[1] MSc in Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Sirjan Branch, Sirjan, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Kerman Branch, Kerman, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Saveh Branch, Saveh, Iran

(Received October 23, 2016, Accepted July 10, 2017)

Abstract

Background and purpose: *Acinetobacter baumannii* is an opportunistic pathogen that remains persistent in the environment for a long time. The eradication of this bacteria is difficult, since it has the ability to acquire antibiotic resistance. The aims of this study were to identify the *ampC* plasmid-mediated genes and antibiotic sensitivity of *Acinetobacter baumannii* strains.

Materials and methods: Sixty strains of *Acinetobacter baumannii* isolates from wound, urine, blood, and respiratory secretions were used. The presence of *ampC* plasmid-mediated genes including *FOX*, *MOX*, *DHA*, *ACC* and *CIT* were evaluated by Multiplex PCR. Antimicrobial susceptibility testing against 5 antibiotics was performed for all isolates.

Results: Multiplex PCR results showed that 39 samples (65%) had the *CIT* gene, 36 (60%) had the *DHA* gene, 12 (20%) had the *MOX* gene and 8 samples (13.3%) harboured *ACC* and *FOX* genes. Based on antibiogram results, the highest rate of resistance was found to cefepime (95%) and the highest rate of sensitivity was to gentamicin (45%).

Conclusion: Current study showed a high percentage of *ampC* plasmid-mediated genes and also high prevalence of antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii*.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, antibiotic resistance, *ampC*, Multiplex PCR.

J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 27(155): 157- 162 (Persian).

Archive of SID

www.SID.ir

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هفتم شماره ۱۵۵ آذر سال ۱۳۹۶ (۱۶۲-۱۵۷)

مطالعه مولکولی همزمان ژن های پلاسمیدیAmpc اسینتوباکتر بومانی جدا شده از مواردبالینی با روش Multiplex_PCR

سجاد فکری[۱]
محمد جواد سلطانی بناوندی[۲]
کیومرث امینی[۳]

چکیده

سابقه و هدف: *آسینتوباکتر بومانی* به عنوان عامل عفونت‌های بیمارستانی به دلیل قابلیت کسب مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها به مدت طولانی در محیط پایدار مانده و ریشه کنی این باکتری را دشوار می‌سازد. هدف مطالعه، شناسایی ژن‌های مقاومت پلاسمیدی ampC و تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های آسینتوباکتر بومانی استبود.

مواد و روش‌ها: ۶۰ سویه *آسینتوباکتر بومانی* جداسازی شده از زخم، ادرار، خون، ترشحات تنفسی و تراشه جمع‌آوری گردید. حضور ژن‌های *ampc* وابسته به پلاسمید شامل *FOX*، *MOX*، *DHA*، *ACC* و *CIT* با روش Multiplex-PCR بررسی شد. آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی علیه ۵ آنتی بیوتیک برای تمام جدایه‌ها انجام گرفت.

یافته‌ها: نتایج Multiplex-PCR نشان داد ۳۹ نمونه (۶۵ درصد) دارای ژن *CIT*، ۳۶ نمونه (۶۰ درصد) دارای ژن *DHA*، ۱۲ نمونه (۲۰ درصد) دارای ژن *MOX* و ۸ نمونه (۱۳/۳ درصد٪) واجد ژن‌های *ACC* و *FOX* بودند. بر اساس نتایج آنتی‌بیوگرام، بیش ترین مقاومت به آنتی‌بیوتیک سفپیم (۹۵ درصد) و بیش‌ترین حساسیت به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین (۴۵ درصد) بود.

استنتاج: نتایج مطالعه حاضر نشان‌دهنده درصد بالای حضور ژن‌های *ampC* وابسته به پلاسمید و هم‌چنین شیوع بالای مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های *آسینتوباکتر بومانی* جدا شده از عفونت‌های مختلف بود.

واژه های کلیدی: *آسینتوباکتر بومانی*، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، *ampC*، Multiplex-PCR

مقدمه

آسینتوباکتر بومانی یک پاتوژن فرصت طلب و عامل عفونت‌های جدی است. این باکتری کمنسال پوست و گلو در انسان می‌باشد و هم‌چنین در خاک و غذاهایی مانند سبزیجات، گوشت و ماهی یافت می‌شود و مسئول طیف وسیعی از عفونت‌های ادراری، زخم، پریتونیت، اندوکاردیت، منتژیت و سپتی‌سمی به خصوص در افراد دارای ضعف سیستم ایمنی می‌باشد. این باکتری قادر به رشد در طیف وسیعی از دما و pH

مولف مسئول: کیومرث امینی– دانشگاه آزاد اسلامی ساوه، گروه میکروبیولوژی Email: dr_kumarss_amini@yahoo.com
۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد سیرجان، دانشگاه آزاد اسلامی، سیرجان، ایران.
۲. دکتری ژنتیک ملکولی، استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان، کرمان، ایران.
۳. استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران.
تاریخ دریافت : ۱۳۹۵/۸/۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۶/۲/۷ تاریخ تصویب : ۱۳۹۶/۴/۱۹

Archive of SID
www.SID.ir

می‌باشد و قادر به زنده‌ماندن در محیط بیمارستان و کسب مقاومت به مواد ضد میکروبی را دارد(۱،۲). تا به امروز برخی سویه‌های آسینتوباکتر بومانی به تمامی آنتی‌بیوتیک‌های رایج مورد استفاده مقاوم شده و این امر درمان این عفونت‌ها را بسیار محدود کرده است(۳،۴). شایع‌ترین مقاومت‌ها در سویه‌های آسینتوباکتر بومانی دارای مقاومت‌های چندگانه عبارتند از: سفالوسپورینازAmpC ، کارباپنماز OXA ، متالوبتالاکتامازها، پمپ ایفلاکس و اینتگرون‌ها. امروزه به دلیل استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های سفالوسپورین، کارباپنم، آمینوگلیکوزید و فلوروکینولون، متاسفانه مقاومت به آن‌ها به فراوانی در سویه‌های بالینی و محیطی این باکتری گزارش شده است(۵).

ژن‌های ampC وابسته به پلاسمید، اولین بار در سال ۱۹۸۹ شناسایی شدند. پس از آن در جدایه‌های بیمارستانی و غیر بیمارستانی به خصوص در باکتری‌های روده‌ای، که دارای ژن‌های متعددی شامل CM ، FOX، ACC، LAT، MOXو DHA می‌باشد و متعلق به کلاس C بتالاکتامازها (سرین بتالاکتاماز) می‌باشند، یافت شدند. آنزیم‌های تولید شده توسط این ژن‌ها نسبت سایر ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام به میزان کم‌تری رایج بوده و مقاومت به طیف وسیعی از بتالاکتام‌ها شامل پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌ها، سفامایسین‌ها و آزترئونام و تا حدودی مقاومت به کارباپنم‌ها را به عهده دارند(۶،۷).

هدف مطالعه حاضر بررسی حضور ژن‌های ampC وابسته به پلاسمید در سویه‌های آسینتوباکتر بومانی جداسازی شده از عفونت‌های مختلف و هم‌چنین تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی این جدایه‌ها بود.

مواد و روش ها

تعداد ۶۰ سویه باکتری آسینتوباکتر بومانی از نمونه‌های خون، ترشحات تنفسی، ادرار، زخم پوست و تراشه در آزمایشگاه میکروب‌شناسی پژوهشی پاسارگاد(تهران،۱۳۹۵) جمع‌آوری گردید. استخراج DNAبا استفاده از کیت تجاری سیناژن انجام شد. آزمایش در حجم ۲۵ میکرولیتر که شامل ۵/۱Mm کلرید منیزیم، ۲۵۰µmol ازdNTP، ۰,۴µmol از هر یک از پرایمرهای اختصاصی و ۱/۲۵ واحد از Taq پلی‌مراز و ۴ میکرولیتر DNAالگو با غلظت (۱۰ نانوگرم) انجام شد (جدول شماره ۱).

شرایط سیکل حرارتی برای PCR: واسرشت اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۳۵ سیکل هرکدام شامل: واسرشت در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در ۵۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، مرحله بسط در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه و نیز بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد(۸). حساسیت ایزوله‌های آسینتوباکتر بومانی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین (۳۰µg)، جنتامایسین (۱۰µg)، سفتریاکسون (۳۰µg)، سفپیم (۳۰µg) و آمیکاسین (۳۰µg) (پادتن طب) به روش دیسک دیفیوژن (Kirby-Bauer) و مطابق با استانداردهای CLSI ((Clinical and Laboratory Standards Institute سنجیده شد(۹،۱۰).

جدول شماره ۱: آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق (۸).

پرایمر	توالی (۵' به ۳')	اندازه محصول (bp)
MOXMF	GCT GCT CAA GGA GCA CAG GAT	۵۲۰
MOXMR	CAC ATT GAC ATA GGT GTG GTG C	
CITMF	TGG CCA GAA CTG ACA GGC AAA	۴۶۲
CITMR	TTT CTC CTG AAC GTG GCT GGC	
DHAMF	AAC TTT CAC AGG TGT GCT GGG T	۴۰۵
DHAMR	CCG TAC GCA TAC TGG CTT TGC	
ACCMF	AAC AGC CTC AGC AGC CGG TTA	۳۴۶
ACCMR	TTC GCC GCA ATC ATC CCT AGC	
FOXMF	AAC ATG GGG TAT CAG GGA GAT G	۱۹۰
FOXMR	CAA AGC GCG TAA CCG GAT TGG	

یافته ها و بحث

بر اساس نتیجه آزمایش M-PCR مشخص گردید ۳۹ نمونه (۶۵ درصد) دارای ژنCIT، ۳۶ نمونه (۶۰ درصد) دارای ژنDHA ، ۱۲ نمونه (۲۰ درصد) دارای

www.SID.ir

ژن MOX و ۸ نمونه (۱۳/۳ درصد) واجد ژن‌های ACC و FOX بودند. هم‌چنین در نتایج آنتی‌بیوگرام مشخص شد بیش‌ترین مقاومت به آنتی‌بیوتیک سفپیم (۹۵ درصد) و بیش‌ترین حساسیت به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین (۴۵ درصد) وجود دارد (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۲: الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی بر حسب درصد

نام آنتی بیوتیک	حساس	نیمه حساس	مقاوم
تتراسیکلین	۳۰	۱۸/۳	۵۱/۷
جنتامایسین	۴۵	۱۶/۶	۳۸/۳
آمیکاسین	۸/۳	۰	۹۱/۷
سفپیم	۳/۳	۱/۶	۹۵
سفتریاکسون	۰	۸/۳	۹۱/۷

بر اساس مطالعه سال ۲۰۰۳ در کشور آمریکا، آسینتوباکتر بومانی رتبه چهارم عفونت‌های بیمارستانی را به خود اختصاص داد(۸). الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی در باکتری‌های مرتبط با عفونت‌های بیمارستانی در مناطق مختلف دنیا متفاوت می‌باشد. جهت درمان عفونت‌های آسینتوباکتر بومانی از آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند سفالوسپورین‌ها، کاربا‌پنم‌ها، آمینوگلیکوزیدها و فلوروکینولون‌ها استفاده می‌شود(۱۱). در مطالعه حاضر، ۹۵ درصد جدایه‌ها به سفپیم، ۹۱/۷ درصد به آمیکاسین و سفتریاکسون، ۵۱/۷ درصد به تتراسایکلین و ۳۸/۳ درصد به جنتامایسین مقاوم بودند. اردبیلی و همکاران در سال ۱۳۹۱، با بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های اسینتوباکتر بومانی، ۶۲ درصد جدایه‌ها به جنتامایسین و ۹۳ درصد به آمیکاسین مقاوم بوده‌اند(۱۲). در مطالعه جعفری و همکاران در سال ۱۳۹۱، ۶۴/۵ درصد به آمیکاسین و ۵۱/۶ درصد به جنتامایسین مقاوم بودند(۱۳). در مطالعه Shanthi و Balagurunathan در سال ۲۰۱۴، ۶۰ سویه آسینتوباکتر بومانی و کلبسیلا پنومونیه از نظر حضور ژن‌های پلاسمیدی ampC بررسی شد که ۱۶ سویه دارای مقاومت چندگانه به آنتی‌بیوتیک‌ها بوده و ۲ سویه کلبسیلا پنومونیه دارای ژن‌های MOX و FOX و دو سویه آسینتوباکتر بومانی دارای ژن DHA بودند(۱۴). در مطالعه Nai-jian و همکاران در سال ۲۰۱۰، فقط دو سویه دارای ژن ACT بودند، اما ژن‌های MOX، FOX، DHA و CIT در هیچ کدام از سویه‌ها شناسایی نگردید(۱۵). در مطالعه Kuo و همکاران در سال ۲۰۱۰، هیچ کدام از ژن‌های ampC betalactamase در سویه‌های آسینتوباکتر بومانی دارای مقاومت چندگانه شناسایی نشد(۱۶). در مطالعه ژاپونی نژاد در سال ۲۰۱۴، فراوانی ژن های CIT۲/۴۲ درصد، MOX۸/۳۶ درصد و DHA۲/۵درصد گزارش گردید(۱۷). در مطالعه حاضر نیز ۶۵ درصد دارای ژن CIT، ۶۰ درصد دارای ژن DHA، ۲۰ درصد دارای ژن MOX و ۱۳/۳ درصد واجد ژن‌های ACC و FOX بودند. نتایج نشان‌دهنده درصد بالای فراوانی ژن‌های ampC وابسته به پلاسمید بوده، اما با این حال حضور این ژن‌ها نیاز به بررسی بیش‌تری دارد. مقاومت بالای آسینتوباکتر بومانی به آنتی‌بیوتیک‌ها بسیار نگران کننده بود، زیرا کنترل و درمان این باکتری را مشکل می‌سازد.

سپاسگزاری

نگارندهٔ این مقاله سپاسگزاری خود را از پرسنل آزمایشگاه پژوهشی میکروبیولوژی پاسارگاد که در انجام مراحل عملی این تحقیق یاری نمودند، اعلام می‌دارد.

References

1. Goudarzi H, Douraghi M, Ghalavand Z, Goudarzi M. Assessment of antibiotic resistance pattern in Acinetobacter baumannii carrying blaoxA type genes isolated from hospitalized patients. Novelty in Biomedicine. 2013;1(2):54-61.(Persian)

Archive of SID

www.SID.ir

2. Anwar M, Ejaz H, Zafar A, Hamid H. Phenotypic detection of metallo-beta-lactamases in carbapenem resistant Acinetobacter baumannii isolated from pediatric patients in Pakistan. J Pathogens .2016; 2016.
3. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect .2012;18(3):268-281.
4. Zarrilli R, Giannouli M, Tomasone F, Triassi M, Tsakris A. Carbapenem resistance in Acinetobacter baumannii: the molecular epidemic features of an emerging problem in health care facilities. J Infect Dev Ctries 2009;3(5):335-341.
5. Poirel L, Nordmann P. Carbapenemresistance in Acinetobacter baumannii:mechanisms and epidemiology. Clin Microbiol Infect 2006; 12: 826–836.
6. Jacoby GA. AmpC β-Lactamases. Clin Microbiol Rev 2009; 22(1): 161-182.
7. Livermore DM and Woodford N. The β-lactamase threat in Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter. Trends Microbiol .2006; 14(9): 412-419.
8. Liu Y and Liu X. Detection of AmpC β-lactamases in Acinetobacter baumannii in the Xuzhou region and analysis of drug resistance. Exp Therap Med 2015; 10(3): 933-936.
9. Bauer A, Kirby WM, Sherris JC, Truck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol. 1996; 45(4): 493-496.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial susceptibility Testing; twenty first Informational Supplement.CSLI. 2011; 31(1):1-172.
11. Prashanth K, Badrinath S. Invitro susceptibility pattern of Acinetobacter species to commonly used cephalosporins, quinolones, and aminoglycosides. Indian J Med Microbiol. 2004; 22(2): 97-103.
12. Ardebili A, Azimi L, Mohammadi-Barzelighi H, Owlia P, Beheshti M, Talebi M, et al. Determination of resistance pattern of isolated Acinetobacter baumannii from hospitalized burned patients in Motahari Hospital, Tehran. J Zanjan Uni Med Sci 2013; 20(83): 112-119.
13. Jafari S, Najafipour S, Kargar M, Abdollahy A, Mardaneh J, Fasihy Ramandy M, et al. Phenotypical evaluation of multi-drug resistant Acinetobacter baumannii. J Fasa Uni of Med Sci 2012; 2(4): 254-258.(Persian)
14. Shanthi J, Balagurunathan R. Characterisation of heteroresistant subcolonies for MBL, AmpC genes in Klebsiella pneumoniae and Acinetobacter baumannii. Indian J Med Microbiol 2014; 32(2): 210-211.
15. Nai-jian L, Yun-jian X, Hui-bing S, Wei-jiao L, Yi-quan L. Study on the antibiotic resistance and ampC gene of multi-drug resistant Acinetobater baumannii. J Trop Med 2010; 6.
16. Kuo S, Fung C, Lee Y, Chen C, Chen T. Bacteremia due to Acinetobacter genomic species 10. J Clin Microbiol. 2010; 48(2): 586-590.

Archive of SID
www.SID.ir

17. Japoni-Nejad A, Ghaznavi-Rad E , van Belkum A. Characterization of plasmid-mediated ampC and carbapenemases among Iranain nosocomial isolates of Klebsiella pneumoniae using phenotyping and genotyping methods. Osong Public Health Res Perspect 2014 5(6): 333-338.

Archive of SID

www.SID.ir