

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

Sajad Fekri<sup>1</sup>,  
Mohammad Javad Soltani Banavandi<sup>2</sup>,  
Kumarss Amini<sup>3</sup>

<sup>1</sup> MSc in Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Sirjan Branch, Sirjan, Iran

<sup>2</sup> Assistant Professor, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Kerman Branch, Kerman, Iran

<sup>3</sup> 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.

## مطالعه مولکولی همزمان ژن های پلاسمیدی *AmpC* اسینتوباکتر بومانی جدا شده از موارد بالینی با روش Multiplex\_PCR

سجاد فکری<sup>۱</sup>

محمد جواد سلطانی بناوندی<sup>۲</sup>

کیومرث امینی<sup>۳</sup>

### چکیده

**سابقه و هدف:** اسینتوباکتر بومانی به عنوان عامل عفونت های بیمارستانی به دلیل قابلیت کسب مقاومت به آنتی بیوتیک ها به مدت طولانی در محیط پایدار مانده و ریشه کنی این باکتری را دشوار می سازد. هدف مطالعه، شناسایی ژن های مقاومت پلاسمیدی *ampC* و تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی سویه های اسینتوباکتر بومانی است.

**مواد و روش ها:** ۶۰ سویه اسینتوباکتر بومانی جدا سازی شده از زخم، ادرار، خون، ترشحات تنفسی و تراشه جمع آوری گردید. حضور ژن های *ampC* وابسته به پلاسمید شامل *FOX*، *MOX*، *DHA*، *ACC* و *CIT* با روش Multiplex-PCR بررسی شد. آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی علیه ۵ آنتی بیوتیک برای تمام جدایه ها انجام گرفت.

**یافته ها:** 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 ژن های *ACC* و *FOX* بودند. بر اساس نتایج آنتی بیوگرام، بیش ترین مقاومت به آنتی بیوتیک سفپیم (۹۵ درصد) و بیش ترین حساسیت به آنتی بیوتیک جنتامایسین (۴۵ درصد) بود.

**استنتاج:** نتایج مطالعه حاضر نشان دهنده درصد بالای حضور ژن های *ampC* وابسته به پلاسمید و هم چنین شیوع بالای مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های اسینتوباکتر بومانی جدا شده از عفونت های مختلف بود.

**واژه های کلیدی:** اسینتوباکتر بومانی، مقاومت آنتی بیوتیکی، *ampC* Multiplex-PCR

### مقدمه

و مسئول طیف وسیعی از عفونت های ادراری، زخم، پرتونیت، اندوکاردیت، مننژیت و سپتی سمی به خصوص در افراد دارای ضعف سیستم ایمنی می باشد. این باکتری قادر به رشد در طیف وسیعی از دما و pH

اسینتوباکتر بومانی یک پاتوژن فرصت طلب و عامل عفونت های جدی است. این باکتری کم سنسال پوست و گلو در انسان می باشد و هم چنین در خاک و غذاهایی مانند سبزیجات، گوشت و ماهی یافت می شود

Email: dr\_kumarss\_amini@yahoo.com

**مؤلف مسئول:** کیومرث امینی - دانشگاه آزاد اسلامی ساوه، گروه میکروبیولوژی

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

تراشه در آزمایشگاه میکروبی شناسی پژوهشی پاسارگاد (تهران، ۱۳۹۵) جمع آوری گردید. استخراج DNA با استفاده از کیت تجاری سیناژن انجام شد. آزمایش در حجم ۲۵ میکرولیتر که شامل ۵/۱Mm کلرید منیزیم، ۲۵۰ μmol از dNTP، ۴ μmol از هر یک از پرایمرهای اختصاصی و ۱/۲۵ واحد از Taq پلی‌مرز و ۴ میکرولیتر DNA الگو 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 هر کدام 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 تراسایکلین (۳۰ μg)، جنتامایسن (۱۰ μg)، سفتریاکسون (۳۰ μg)، سفپیم (۳۰ μg) و آمیکاسین (۳۰ μg) (پادتن طب) به روش دیسک دیفیوژن (Kirby-Bauer) و مطابق با استانداردهای ((Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) سنجیده شد (۹، ۱۰).

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

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

## یافته‌ها و بحث

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

می‌باشد و قادر به زنده ماندن 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 (۴، ۳). شایع‌ترین مقاومت‌ها در سویه‌های آسینتوباکتر بومانی دارای مقاومت‌های چندگانه عبارتند از: سفالوسپوریناز AmpC، کارباپنم‌آز OXA، متالوبتالاکتامازها، پمپ ایفلاکس و اینتگرون‌ها. امروزه به دلیل استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های سفالوسپورین، کارباپنم، آمینو گلیکوزید 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، MOX و 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 آزترونام 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 روش‌ها

تعداد ۶۰ سویه باکتری آسینتوباکتر بومانی از نمونه‌های خون، ترشحات تنفسی، ادرار، زخم پوست و

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 آنتی‌بیوتیکی بر حسب

درصد

نام آنتی‌بیوتیک	حساس	نیمه‌حساس	مقاوم
تتراسایکلین	۳۰	۱۸/۳	۵۱/۷
جنتامایسین	۴۵	۱۶/۶	۳۸/۳
آمیکاسین	۸۳	۰	۹۱/۷
سفپیم	۳۳	۱/۶	۹۵
سفتراکسون	۰	۸۳	۹۱/۷

بر اساس مطالعه سال ۲۰۰۳ در کشور آمریکا، آسینتوباکتر بومانی رتبه چهارم عفونت‌های بیمارستانی را به خود اختصاص داد (۸). الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی 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 جدا‌یها به سفپیم، ۹۱/۷ درصد به آمیکاسین و سفتراکسون، 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 آسینتوباکتر بومانی، ۶۲ درصد جدا‌یها 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 Balagurunathan و Shanthi 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 FOX، MOX، 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 ژن‌های CIT ۲/۴۲ درصد، MOX ۸/۳۶ درصد و DHA ۲/۵۵ درصد 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 نگران‌کننده بود، زیرا کنترل و درمان این باکتری را مشکل می‌سازد.

## سپاسگزاری

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

## References

- 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 in Biomedicine*. 2013;1(2):54-61.(Persian)

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. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 826-836.
6. Jacoby GA. AmpC  $\beta$ -Lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22(1): 161-182.
7. Livermore DM and Woodford N. The  $\beta$ -lactamase threat in Enterobacteriaceae, Pseudomonas and *Acinetobacter*. *Trends Microbiol*. 2006; 14(9): 412-419.
8. Liu Y and Liu X. Detection of AmpC  $\beta$ -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 *Acinetobacter 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.

---

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.