

Molecular Detection of Type II Toxin-Antitoxin Systems and their Association with Antibiotic Resistance and Biofilm Formation in Clinical *Acinetobacter baumannii* Isolates of Burn Patients

Elham Haghighifar¹,
Bahram Nasr Esfahani²,
Hossein Fazeli²

¹ MSc Student in Medical Microbiology and Virology, Faculty of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

² Professor, Department of Bacteriology and Virology, Faculty of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

(Received August 25, 2020 ; Accepted November 29, 2020)

Abstract

Background and purpose: Burn wounds are a good host for infections. *Acinetobacter baumannii* is an opportunistic bacterium in patients with burn infections. Toxin-antitoxin systems (TAs) are genetic elements that are essential for antibiotic resistance and biofilm formation in bacteria, including higBA and relBE TA systems. The present study aimed to investigate the frequency of higBA and relBE genes in *A. baumannii* strains isolated from burn wound infection as well as the association between genetic elements and antibiotic resistance and biofilm formation.

Materials and methods: In this descriptive cross-sectional study, 139 *A. baumannii* isolates were collected from burn wounds of patients hospitalized in a burn center in Isfahan, Iran. The isolates were identified and confirmed through biochemical and molecular tests. Antibiotic susceptibility testing was performed via disk diffusion method and biofilm production was detected by microtiter plate assay. Presence of higBA and relBE TA system genes was investigated by PCR.

Results: Out of 139 *A. baumannii* isolates, 114 were multi-drug resistant (MDR) and able to form biofilm. relBE and higBA genes were observed in 94.73% and 8.77% of the isolates, respectively. Significant correlations were found between the presence of relBE and higBA genes and resistance to imipenem and levofloxacin ($P < 0.05$). There were no significant correlations between presence of relBE and higBA genes and biofilm formation ($P > 0.05$).

Conclusion: In this study, the number of MDR *A. baumannii* strains was significantly higher compared to previous studies and most species had the ability to form biofilms. According to the association between TA genes and antibiotic resistance, further studies are needed on the TA systems.

Keywords: toxin-antitoxin systems, *Acinetobacter baumannii*, biofilm, antibiotic resistance

J Mazandaran Univ Med Sci 2021; 30 (194): 23-32 (Persian).

* Corresponding Author: Hossein Fazeli - Department of Bacteriology and Virology, Isfahan University of Medical Science, Isfahan, Iran (E-mail: h_fazeli@med.mui.ac.ir)

ارزیابی مولکولی سیستم توکسین-آنتی توکسین نوع دو در ایزوله های تولید کننده بیوفیلم *اسینتوباکتر بانونامانی* مقاوم به چند دارو جدا شده از نمونه های زخم های سوختگی

الهام حقیقی فر¹

بهرام نصر اصفهانی²

حسین فاضلی²

چکیده

سابقه و هدف: زخم سوختگی، میزبان مناسبی برای عفونت ها است. *اسینتوباکتر بانونامانی* یکی از باکتری های فرصت طلب در بیماران دارای عفونت زخم سوختگی می باشد. سیستم های توکسین-آنتی توکسین (TA) عناصر ژنتیکی هستند که برای مقاومت آنتی بیوتیکی و تشکیل بیوفیلم در باکتری ها ضروری می باشند. از جمله آن ها higBA و relBE است. این مطالعه با هدف تعیین فراوانی ژن های relBE و higBA و ارتباط آن ها با مقاومت آنتی بیوتیکی و تشکیل بیوفیلم انجام شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه توصیفی-مقطعی تعداد 139 ایزوله *اسینتوباکتر بانونامانی* از زخم سوختگی بیماران بستری در بیمارستان امام موسی کاظم اصفهان جمع آوری و با استفاده از تست های بیوشیمیایی و ژنتیکی شناسایی و تایید شد. تست حساسیت آنتی بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن و سنجش بیوفیلم با میکروتیتر پلیت انجام شد. حضور ژن های higBA و relBE با تکنیک PCR بررسی و سپس آنالیز آماری انجام شد.

یافته ها: از 139 ایزوله، 114 ایزوله مقاوم چند دارویی (MDR) و تشکیل دهنده بیوفیلم بودند. 94/73 درصد دارای ژن relBE و 8/77 درصد، ژن higBA داشتند. بین حضور ژن های relBE و higBA با مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ایملی پنم و لووفلو کساسین ارتباط معنی داری وجود داشت ($P < 0/05$). حضور relBE و higBA با تشکیل بیوفیلم ارتباط معنی داری نداشتند ($P > 0/05$).

استنتاج: در این مطالعه ایزوله های MDR *اسینتوباکتر بانونامانی* در مقایسه با مطالعات قبلی افزایش معنی داری داشت و بسیاری از گونه ها توان بالایی در تشکیل بیوفیلم داشتند. بین حضور ژن های TA و مقاومت آنتی بیوتیکی نیز ارتباط معنی داری وجود داشت که بر این اساس مطالعات بیش تر در این زمینه ضروری به نظر می رسد.

واژه های کلیدی: سیستم های توکسین-آنتی توکسین، *اسینتوباکتر بانونامانی*، بیوفیلم، مقاومت آنتی بیوتیکی

مقدمه

سوختگی می تواند میزبان بسیار مناسبی برای عفونت های میکروارگانیسم ها باکتری گرم منفی، فرصت طلب و غیر مربوط به میکروارگانیسم های مختلف باشد. از جمله این

E-mail: h_fazeli@med.mui.ac.ir

مؤلف مسئول: حسین فاضلی - اصفهان: دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، گروه باکتری شناسی و ویروس شناسی

1. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران

2. استاد، گروه باکتری شناسی و ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: 1399/6/4 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1399/6/30 تاریخ تصویب: 1399/9/9

خانواده (Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, and Enterobacter species) محسوب می‌شود که در رابطه با مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در عفونت‌های انسانی بسیار مشکل‌ساز می‌شوند و می‌توانند منجر به شیوع مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی شوند (2،1).

اسینتوباکتر بومانی ظرفیت بالایی در کلونیزاسیون و تشکیل بیوفیلم (مجموعه‌ای از میکروارگانیسم‌ها که در ماتریکس تجمع می‌کنند و باعث ایجاد شرایط محافظت شده‌ای برای میکروارگانیسم‌ها می‌شود) روی سطوح زنده و غیرزنده دارد که فاکتور مهمی در افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این باکتری خصوصاً در ایزوله‌های موجود در عفونت زخم سوختگی است. سویه‌هایی از اسینتوباکتر بومانی که توان تشکیل بیوفیلم دارند نسبت به سویه‌های پلانکتونی، مرگ‌ومیر بیماران دارای عفونت را به میزان قابل توجهی افزایش می‌دهند. ایزوله‌هایی که مقاوم چند دارویی (MDR) هستند، می‌توانند باعث شیوع مقاومت‌های دارویی در سایر ایزوله‌ها شوند. ظهور سویه‌های مقاوم چند دارویی می‌تواند از جمله علت‌های بسیار پر اهمیت شکست درمان در بیماران خصوصاً بیماران سوختگی باشد (3-8). اسینتوباکتر بومانی دارای عوامل ژنتیکی با عنوان سیستم‌های توکسین-آنتی‌توکسین می‌باشد. سیستم‌های توکسین-آنتی‌توکسین (TA) بر روی عناصر ژنتیکی متحرک، پلاسمیدها و کروموزوم‌ها در باکتری‌ها و آرکی‌ها قرار دارند (9،10). این عناصر ژنتیکی به 6 نوع تقسیم می‌شوند. در این سیستم‌ها توکسین (که جزء پایدار سیستم است) همواره از جنس پروتئین می‌باشد و آنتی‌توکسین (که جزء ناپایدار سیستم است) یا از جنس پروتئین مانند سیستم‌های TA نوع ۲،۴ و 5 می‌باشد و یا از جنس RNA مانند سیستم‌های TA نوع 3 و 1 است. تایپ 6 نیز اخیراً کشف شده است. آنتی‌توکسین استراتژی پیشگیری از فعالیت توکسین با اتصال به توکسین به‌طور مستقیم و یا غیر مستقیم با تعامل با سایر فاکتورهای سیگنالینگ و تنظیم ترجمه و رونویسی را برعهده دارد. با توجه به این که این عناصر

ژنتیکی در ارتباط با استرس هستند آنتی‌توکسین می‌تواند با تأثیر بر توکسین در شرایط استرس بر بسیاری از فعالیت‌های سلولی مثل رونویسی و ترجمه تأثیرگذار باشد (11،12). در اواسط دهه 1980 سیستم TA نوع 2 کشف شد. توکسین و آنتی‌توکسین هر دو از پروتئین ساخته شده‌اند. از جمله سیستم‌های TA نوع 2 higBA و relBE هستند. مطالعاتی بر روی تأثیر این سیستم‌ها بر مقاومت آنتی‌بیوتیکی و تشکیل بیوفیلم در باکتری‌های گرم منفی به صورت محدود صورت گرفته است، اما این مطالعه در اسینتوباکتر بومانی جدا شده شده از عفونت زخم سوختگی با توجه به تأثیری که می‌تواند به واسطه توانایی بالا در تشکیل بیوفیلم و کسب مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی بر درمان بیماران سوختگی داشته باشد صورت نگرفته است (13-15). این مطالعه با هدف بررسی میزان حضور ژن‌های TA نوع higBA و relBE و ارتباط آن‌ها با مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و تشکیل بیوفیلم در سویه‌های اسینتوباکتر جدا شده از عفونت زخم سوختگی صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی - مقطعی تعداد 139 ایزوله اسینتوباکتر بومانی غیر تکراری از بیماران زخم سوختگی بستری در بیمارستان امام موسی کاظم شهر اصفهان بر اساس فرمول حجم نمونه و بررسی مطالعات قبلی در فاصله زمانی نیمه دوم فروردین سال 97 تا انتهای خرداد سال 98 جمع‌آوری شد. ایزوله‌ها بعد از کشت بر روی محیط کشت‌های بلاد آگار و EMB و رنگ‌آمیزی گرم با روش‌های بیوشیمیایی مانند TSI (Triple sugar iron agar)، OF (oxidation-fermentation) و اکسیداز مورد بررسی قرار گرفتند و سپس به روش PCR و با استفاده از ژن bla_{oxa-51} تأیید شد. میزان حضور ژن‌های higBA و relBE نیز به روش PCR بررسی و سپس بر روی داده‌های حاصل آنالیز آماری انجام گرفت و آماده گزارش شد (2،16).

تست حساسیت آنتی بیوتیکی:

تست حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله های آسینتوباکتر بومانی به روش دیسک دیفیوژن برای 10 آنتی بیوتیک انجام گرفت که شامل (جتتامایسین $10 \mu\text{g}$)، سفنازیدیم ($30 \mu\text{g}$)، ایمی پنم ($10 \mu\text{g}$)، توبرامایسین ($10 \mu\text{g}$)، لوفلو کساسین ($5 \mu\text{g}$)، سیپروفلوکساسین ($10 \mu\text{g}$)، تری متوپریم ($1/25 \mu\text{g}$) -سولفامتو کسازول ($32/75 \mu\text{g}$)، سفپیم ($30 \mu\text{g}$)، سفتریاکسون ($30 \mu\text{g}$)، پیراسیلین ($100 \mu\text{g}$) -تازوبا کتام ($10 \mu\text{g}$) (شرکت بیدی) بودند (18، 17). نتایج براساس استانداردهای CLSI، 2018 تفسیر گردید. سویه هایی که حداقل به سه کلاس آنتی بیوتیکی مقاوم بود به عنوان سویه های مقاوم چند دارویی (MDR) در نظر گرفته شد (19، 20). از اشرشیاکلی 25922 به عنوان سویه کنترل استفاده شد (21).

بررسی تشکیل بیوفیلم: ایزوله های آسینتوباکتر بومانی به مدت یک شب در تریپتیکاز سوی برات با 0/25 درصد گلوکز در 37 درجه سانتی گراد کشت داده شد. با غلظت 1:40 در تریپتیکاز سوی برات با 0/25 درصد گلوکز رقیق شد و سپس از این محیط درهریک از چاهک های میکروتیرپلیت 96 خانه 200 میکرولیتر ریخته شد. بعد از 24 ساعت با دمای 37 درجه سانتی گراد، چاهک ها را خالی و سه بار با فسفات بافر سالین شستشو داده شد و در حالت معکوس قرار داده شد تا خشک شوند. با کریستال ویوله 1 درصد به مدت 15 دقیقه رنگ آمیزی و سپس با آب شیر شستشو داده شد. 200 میلی لیتر از اتانول-استون (80:20v/v) به هر چاهک اضافه شد و جذب نوری آن در طول موج 595 (OD 595) با استفاده از دستگاه الیزا ریدر قرائت و برای هر نمونه 3 بار تکرار شد، سپس مطابق رابطه زیر شدت تشکیل بیوفیلم تعیین گردید. $OD_{595} < 1$ عدم تشکیل بیوفیلم، $1 < OD_{595} < 2$ ضعیف، $2 < OD_{595} < 3$ متوسط، $3 < OD_{595}$ قوی (22). آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار spss ورژن 24 انجام گرفت (4).

استخراج DNA و بررسی کمی و کیفی DNA ژنومی استخراج شده

برای بررسی از دستگاه نانودراپ استفاده شد. در صورتی که نسبت A260/A280 بین 1/8 تا 2 باشد DNA مطلوب و مورد قبول است، مقادیر کم تر نشانگر آلودگی با پروتئین و مقادیر بیش تر نشانگر آلودگی با RNA است. در این مطالعه مقادیر بین 1/8-2/1 بود (23).

واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR):

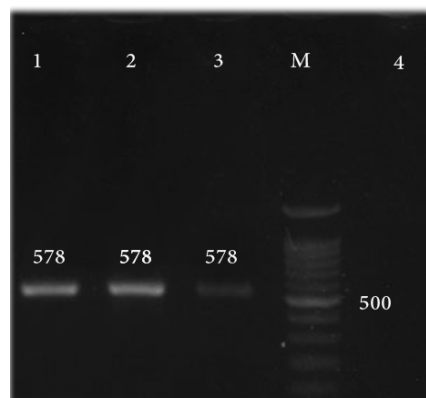
استخراج DNA به روش فنل-کلر فرم انجام گرفت. ایزوله های آسینتوباکتر بومانی به روش PCR و با استفاده از ژن bla_{OXA-51} با طول باند 353 bp و توالی forward: 5-TAATGCTTTGATCGG CCTTG-3 و reverse: 5-TGGATTGCACTTCATCTTGG-3 مورد تأیید قرار گرفت. فراوانی ژن higBA با استفاده از پرایمر با توالی forward: 5-ATGAAGTGAACGGTCAACAA و reverse: 5-ACAGACCTCGGAAAGTGGTCG-3 طول باند 440 bp و فراوانی ژن relBE با استفاده از پرایمر forward: 5-TAATGCTTTGATCGGCCTTG-3 و reverse: 5-TGGATTGCACTTCATCTTGG-3 طول باند 578 bp در سویه های مقاوم چند دارویی با توان تشکیل بیوفیلم نیز به روش PCR مورد بررسی قرار گرفت. حجم کل 25 μl بود که میزان Master Mix (شرکت دانمارک) 12/5 μl ، DNA 1 μl و از هر پرایمر 1 μl در نظر گرفته شد. برای ژن relBE دمای اتصال 58 درجه سانتی گراد به مدت 30 ثانیه در نظر گرفته شد. برای ژن higBA دمای اتصال 56 درجه سانتی گراد به مدت 1/5 دقیقه در نظر گرفته شد. برای سویه کنترل مثبت از سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا 27853 استفاده شد. از دماهای ذکر شده برای DNA بهینه سازی شده است. در پایان محصول با استفاده از ژل الکتروفورز مشاهده گردید. تصویر شماره 1 و 2، نتایج PCR برای ژن های higBA و relBE را نشان می دهد (24-27).

یافته ها

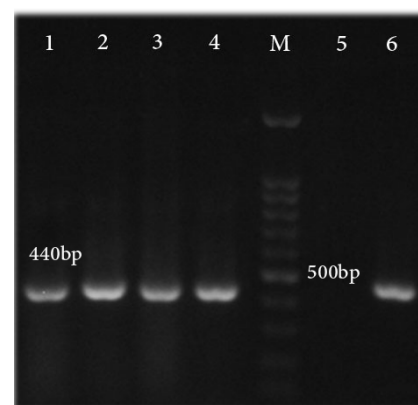
در مجموع 139 ایزوله از نمونه‌های زخم سوختگی بیماران بستری در بیمارستان امام موسی کاظم شهر اصفهان جمع‌آوری شد. تمامی ایزوله‌ها از لحاظ تست‌های تشخیصی بیوشیمیایی دارای الگوی یکسانی بودند. همه آن‌ها از نظر تست اکسیداز منفی، تست TSI به صورت K/K و تست OF به صورت اکسیداسیون (O) مثبت و تخمیر (F) منفی بودند. از 139 ایزوله 132 نمونه همزمان به سه کلاس آنتی‌بیوتیکی مقاوم و 114 ایزوله دارای توان تشکیل بیوفیلم بودند، 4 ایزوله بیوفیلم قوی، 64 ایزوله بیوفیلم متوسط و 46 ایزوله دارای بیوفیلم ضعیف بود و تنها (18 درصد) 25 ایزوله فاقد توانایی تشکیل بیوفیلم بودند. 114 ایزوله نیز همزمان MDR و دارای توان تشکیل بیوفیلم بودند که وارد مطالعه شدند و از نظر حضور ژن‌های سیستم TA نوع higBA و relBE و ارتباط بین حضور آن‌ها و مقاومت آنتی‌بیوتیکی و توان تشکیل بیوفیلم مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج حاصل از تست آنتی‌بیوگرام نشان داد که در میان ایزوله‌های دارای ژن relBE بیش‌ترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به آنتی‌بیوتیک سفنازیدیم (100 درصد) و کم‌ترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به آنتی‌بیوتیک توبرامایسین (67/88 درصد) بود. در میان سویه‌های فاقد ژن relBE تمام ایزوله‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های سفنازیدیم، جنتامایسین، پیراسیلین-تازوباکتام، تریمتوپریم-سولفامتوکسازول و سیپروفلوکساسین مقاوم بودند و کم‌ترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به آنتی‌بیوتیک سفپیم (60 درصد) بود. همچنین در ایزوله‌های دارای ژن higBA، تمام ایزوله‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های سفنازیدیم، جنتامایسین، کوتریموکسازول و سیپروفلوکساسین مقاوم بودند و کم‌ترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به آنتی‌بیوتیک سفپیم (40 درصد) بوده است.

نتایج PCR بر روی 114 ایزوله مقاوم چند دارویی و تشکیل‌دهنده بیوفیلم/اسینتوباکتر بومانی نشان داد که



تصویر شماره 1: الکتروفورز محصول PCR ژن relBE اسینتوباکتر بومانی در ژل آگارز
Ladder 100bp = M، باند 1 و 2 نمونه‌های بالینی اسینتوباکتر بومانی، باند 3 کنترل مثبت، باند 4 کنترل منفی



تصویر شماره 2: الکتروفورز محصول PCR ژن higBA اسینتوباکتر بومانی در ژل آگارز
{باند 1، 2، 3، 4 نمونه‌های بالینی اسینتوباکتر بومانی، Ladder 100bp = M، باند 5 کنترل منفی، باند 6 کنترل مثبت}

روش تجزیه و تحلیل داده ها:

داده‌ها پس از جمع‌آوری در رایانه وارد شده جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها و آنالیز آماری از نرم‌افزار SPSS ورژن 24 و آزمون‌های دقیق فیشر (Fisher's Exact Test) و کای اسکور (Chi-Square test) استفاده شد و ارتباط بین توان تشکیل بیوفیلم و مقاومت آنتی‌بیوتیکی با حضور ژن‌های سیستم توکسین-آنتی‌توکسین نوع higBA و relBE مورد بررسی قرار گرفت.

بحث

اسیتوباکتر بومانی یک پاتوژن فرصت طلب با انتشار وسیع در بخش سوختگی است (7). شیوع سویه‌های MDR در میان ایزوله‌های اسیتوباکتر خصوصا در بیماران سوختگی به سرعت در حال افزایش است (25، 28). ظهور این سویه‌های باکتریایی به عنوان اصلی‌ترین علت شکست درمان در نظر گرفته شده است (5). از جمله عوامل موثر در افزایش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی تشکیل بیوفیلم است. مطالعات صورت گرفته نشان داده است که عوامل مختلفی می‌توانند برافزایش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و تشکیل بیوفیلم تاثیر گذار باشند، از جمله این عوامل سیستم‌های توکسین-آنتی توکسین هستند (29). در مطالعه حاضر فراوانی ژن‌های سیستم توکسین-آنتی توکسین relBE و higBA به ترتیب 95/61 و 8/77 درصد بود. در مطالعه انجام شده توسط غفوریان و همکاران در سال 2014 بر روی ژن‌های higBA و relBE در اسیتوباکتر بومانی فراوانی ژن‌های مربوطه به ترتیب 4/7 و 88/2 درصد بود. در تمام ایزوله‌هایی که ژن‌های مربوطه حضور داشته‌اند بیان ژن صورت گرفته است، این موضوع نشان می‌دهد در صورت حضور ژن‌های سیستم TA در باکتری نقش آن‌ها کاملا کاربردی است (24).

در مطالعه انجام شده توسط Maghraby و همکاران در کشور مصر در سال 2018 فراوانی ژن‌های relBE و higBA به ترتیب 81/5 و 29/6 درصد گزارش شد که از نظر فراوانی با مطالعه حاضر تفاوت‌هایی وجود دارد که می‌تواند به دلیل جدا شدن سویه‌ها از بخش‌های مختلف بیمارستان و یا مربوط به پلاسمیدی بودن ژن‌ها و وجود یا عدم وجود شرایط مطلوب برای انتقال آن‌ها باشد (30). در شرایط مطلوب امکان انتقال پلاسمیدها و به طبع انتقال ژن‌های موجود در ژنوم آن‌ها راحت‌تر بوده و در نتیجه منجر به افزایش فراوانی ژن‌های مربوطه در میان ایزوله‌های مورد مطالعه می‌شود. در مطالعه حاضر بین حضور ژن‌های توکسین-آنتی توکسین و بیوفیلم ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد اما در مطالعه انجام شده توسط

فراوانی ژن relBE در میان نمونه‌های مورد مطالعه، 109 (95/61 درصد) ایزوله و فراوانی ژن higBA 10 (8/77 درصد) بوده است (تصویر شماره 1 و 2). براساس نتایج حاصل از روش میکروتیتر پلیت، در سویه‌های دارای ژن relBE 43 درصد بیوفیلم ضعیف، 53 درصد بیوفیلم متوسط و 3 درصد دارای بیوفیلم قوی بودند. همچنین در سویه‌های دارای ژن higBA، 4 ایزوله بیوفیلم ضعیف، 6 ایزوله بیوفیلم متوسط داشتند و هیچ ایزوله‌ای دارای بیوفیلم قوی نبودند. نتایج حاصل از آنالیزهای آماری با توجه به فراوانی ژن‌های relBE و higBA ارتباط معنی‌داری بین فراوانی ژن‌های مربوطه با مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ای‌می‌پنم و لوفلوکساسین نشان داد (جدول شماره 1 و 2). با توجه به فراوانی ژن‌های مورد مطالعه ارتباط معنی‌داری بین فراوانی ژن‌های relBE و higBA با تشکیل بیوفیلم مشاهده نشد.

جدول شماره 1: ارتباط بین حضور ژن relBE و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی

آنتی بیوتیک	مقاوم و دارای ژن relBE تعداد (درصد)	حساسیت حد واسطه و دارای ژن relBE تعداد (درصد)	حساس و دارای ژن relBE تعداد (درصد)	سطح معنی داری
ایمی پنم	99(90/62)	2(1/63)	8(7/33)	0/000
سفتراکسون	102(93/67)	7(6/42)	0	0/501
سفتازیدیم	109(100)	0	0	0/817
جنتامایسین	79(72/47)	4(3/66)	26(23/65)	0/485
سفیتم	79(72/47)	23(21/10)	7(6/42)	0/721
توبرامایسین	74(67/88)	2(1/63)	33(30/27)	0/761
پیراسلین-آزوتیام	101(92/66)	6(5/25)	2(1/63)	0/328
تری متوپریم-سولفونامید کسازول	105(96/33)	3(2/75)	1(0/81)	0/460
سیروفلوکساسین	107(98/16)	0	2(1/63)	0/389
لوفلوکساسین	81(74/31)	26(23/15)	2(1/63)	0/042

جدول شماره 1: ارتباط بین حضور ژن higBA و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی

آنتی بیوتیک	مقاوم و دارای ژن higBA تعداد (درصد)	حساسیت حد واسطه و دارای ژن higBA تعداد (درصد)	حساس و دارای ژن higBA تعداد (درصد)	سطح معنی داری
ایمی پنم	8(80)	2(20)	0	0/004
سفتراکسون	9(10)	1(10)	0	0/331
سفتازیدیم	10(10)	0	0	0/769
جنتامایسین	10(10)	0	0	0/522
سفیتم	4(40)	5(50)	1(10)	0/985
توبرامایسین	5(50)	1(10)	4(40)	0/331
پیراسلین-آزوتیام	9(90)	1(10)	0	0/885
تری متوپریم-سولفونامید کسازول	10(100)	0	0	0/307
سیروفلوکساسین	10(100)	0	0	0/616
لوفلوکساسین	5(50)	3(30)	2(20)	0/045

wood و همکاران در سال 2016 در پنسیلوانیا نشان داده شد که با فعال شدن توکسین higB میزان بیوفیلیم در سودوموناس آئروژینوزا کاهش می‌یابد (14). علت عدم معنی‌دار بودن ارتباط بین حضور ژن‌ها و تشکیل بیوفیلیم می‌تواند مربوط به نوع باکتری و توان متفاوت آن در مقایسه با سایر باکتری‌ها در تشکیل بیوفیلیم، محل متفاوت جداسازی نمونه‌ها و یا به دلیل متفاوت بودن ژن انتخابی باشد همچنین در مطالعات قبلی تأثیر حضور ژن‌های سیستم توکسین-آنتی‌توکسین در تشکیل بیوفیلیم در سودوموناس آئروژینوزا بررسی شده بود که به دلیل تفاوت‌های ساختاری و عوامل موثر بر تشکیل بیوفیلیم که با/سیتوباکتر بومانی دارد می‌تواند بر نتایج حاصل از مطالعه بر روی دو باکتری اثرگذار باشد. در مطالعه حاضر بین حضور سیستم توکسین-آنتی‌توکسین relBE و مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های لووفلوکساسین ($P=0/042$) و ایمپنم ($P=0/000$) ارتباط معنی‌داری مشاهده شد. همچنین بین حضور سیستم توکسین-آنتی‌توکسین higBA و مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های لووفلوکساسین ($P=0/045$) و ایمپنم ($P=0/004$) ارتباط معنی‌داری مشاهده شد. در مطالعه انجام شده در سال 2014 توسط همتی و همکاران بر روی ژن mazEF در سودوموناس آئروژینوزا بین ژن‌های mazEF و مقاومت به جنتامایسین ($P=0/027$)، مروپنم ($P=0/022$) و پپراسیلین ($P=0/011$) ارتباط معنی‌داری وجود داشت (15). در مطالعه انجام شده در سال 2018 توسط Coskun و همکاران در کشور ترکیه بر روی ژن‌های higBA، relBE و mazEF در سودوموناس آئروژینوزا بین بیان ژن relBE و حساسیت به آزترئونام ارتباط معنی‌داری وجود داشت ($P<0/05$)، همچنین بین سطح بیان mazEF و مقاومت به جنتامایسین، سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین نیز ارتباط معنی‌داری وجود داشت. اما بین ژن higBA و مقاومت آنتی‌بیوتیکی ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد (31).

با توجه به این که تأثیر این ژن‌ها مربوط به کاهش یا افزایش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی است و به‌طور مستقیم

باعث ایجاد مقاومت نمی‌شوند. بنابراین دلیل معنی‌داری برای دو آنتی‌بیوتیک می‌تواند مربوط به حضور ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی مختلف در مجاورت این ژن‌ها بر روی پلاسمید و یا بیان متفاوت این ژن‌ها و ژن‌های مجاور آن‌ها در سویه‌های مختلف باشد. با توجه به نقش بیوفیلیم در مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و همچنین اهمیتی که مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در درمان بیماران دارد و همچنین توان سیستم‌های توکسین آنتی‌توکسین در تأثیر بر آن‌ها و با توجه به این که مطالعات اندکی بر روی این سیستم‌ها صورت گرفته است نیاز به مطالعات بیش‌تر در این زمینه لازم به نظر می‌رسد.

نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نشان‌دهنده شیوع بالای مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بیماران سوختگی در شهر اصفهان و همچنین روند رو به رشد در شیوع سویه‌های MDR و همچنین سویه‌های با توان بالا در تشکیل بیوفیلیم است. شناسایی این سویه‌ها و کنترل به موقع آن‌ها از پیامدهای جانی و مالی بسیاری جلوگیری خواهد کرد. با توجه به ارتباط معنی‌داری که بین ژن higBA و relBE و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف وجود داشت، می‌توان با شناسایی سویه‌های دارای این ژن‌ها در بیماران و هدف قرار دادن این ژن‌ها و با ایجاد تداخل در عملکرد آن‌ها از افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی و تشکیل بیوفیلیم جلوگیری کرد، که نتیجه تمام این موارد ذکر شده کمک به عدم افزایش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و درمان مناسب بیماران و کاهش مرگ و میر ناشی از افزایش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی خواهد بود.

سپاسگزاری

این مقاله براساس نتایج پایان‌نامه دانشجویی دوره کارشناسی ارشد با شماره 397050 (با کد اخلاق: IR.MUL.RESEARCH.REC.1397.114) انجام پذیرفته است. نویسندگان این مقاله مراتب قدردانی و تشکر خود را از گروه باکتری‌شناسی و ویروس‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان اعلام می‌دارد.

References

1. Flynn PB, Graham WG, Gilmore BF. *Acinetobacter baumannii* biofilm biomass mediates tolerance to cold plasma. *Lett Appl Microbiol* 2019; 68(4): 344-349.
2. Babaei AH, Pouladfar G, Pourabbas B, Jafarpour Z, Ektesabi S, Abbasi P. Seven-Year Trend of Antimicrobial Resistance of *Acinetobacter* and *Pseudomonas* spp. Causing Bloodstream Infections: A Retrospective Study from Shiraz, Southern Iran. *Jundishapur J Microbiol* 2019; 12(4): e85819.
3. Lin M-F, Lin Y-Y, Lan C-Y. A method to assess influence of different medical tubing on biofilm formation by *Acinetobacter baumannii*. *J Microbiol Methods* 2019; 160: 84-86.
4. Cevahir N, Demir M, Kaleli I, Gurbuz M, Tikvesli S. Evaluation of biofilm production, gelatinase activity, and mannose-resistant hemagglutination in *Acinetobacter baumannii* strains. *J Microbiol Immunol Infect* 2008; 41(6): 513-518.
5. Lacmata ST, Kuete V, Dzoyem JP, Tankeo SB, Teke GN, Kuete JR. Antibacterial activities of selected Cameroonian plants and their synergistic effects with antibiotics against bacteria expressing MDR phenotypes. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012; 2012: 623723.
6. Feng DY, Zhou YQ, Zou XL, Zhou M, Wu WB, Chen XX, et al. Factors influencing mortality in hospital-acquired pneumonia caused by Gram-negative bacteria in China. *J Infect Public Health* 2019; 12(5): 630-633.
7. Zubair M, Malik A, Ahmad J, Rizvi M, Farooqui KJ, Rizvi MW. A study of biofilm production by gram-negative organisms isolated from diabetic foot ulcer patients. *Biol Med* 2011; 3(2): 147-157.
8. Gupta M, Naik AK, Singh SK. Bacteriological profile and antimicrobial resistance patterns of burn wound infections in a tertiary care hospital. *Heliyon* 2019; 5(12): e02956.
9. Kamruzzaman M, Iredell J. A ParDE-family toxin antitoxin system in major resistance plasmids of Enterobacteriaceae confers antibiotic and heat tolerance. *Scientific Reports* 2019; 9(1): 9872.
10. Goormaghtigh F, Fraikin N, Putrinš M, Hallaert T, Hauryliuk V, Garcia-Pino A, et al. Reassessing the role of type II toxin-antitoxin systems in formation of *Escherichia coli* type II persister cells. *MBio* 2018; 9(3): e00640-18.
11. Fernández-García L, Blasco L, Lopez M, Bou G, García-Contreras R, Wood T, et al. Toxin-antitoxin systems in clinical pathogens. *Toxins* 2016; 8(7): 227.
12. Harms A, Brodersen DE, Mitarai N, Gerdes K. Toxins, targets, and triggers: an overview of toxin-antitoxin biology. *Mol Cell* 2018; 70(5): 768-784.
13. Karimi S, Ghafourian S, Kalani MT, Jalilian FA, Hemati S, Sadeghifard N. Association between toxin-antitoxin systems and biofilm formation. *Jundishapur J Microbiol* 2015; 8(1): e59746.
14. Wood TL, Wood TK. The HigB/HigA toxin/antitoxin system of *Pseudomonas aeruginosa* influences the virulence factors pyochelin, pyocyanin, and biofilm formation. *Microbiologyopen* 2016; 5(3): 499-511.
15. Hemati S, Azizi-Jalilian F, Pakzad I, Taherikalani M, Maleki A, Karimi S, et al. The correlation between the presence of quorum sensing, toxin-antitoxin system genes and MIC values with ability of biofilm

- formation in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Iran J Microbiol 2014; 6(3): 133-139.
16. Fazeli H, Taraghian A, Poursina F, Kamali R. Molecular identification of Esbl Genes Bla-Shv, Bla-Veb, and Bla-Per, in *Acinetobacter baumannii* isolated from patients admitted in a university hospital in Isfahan. Iranian Journal of Public Health 2014; 43(2): 39.
17. Fazeli H, Kamali Dolatabadi R, Taraghian A, Nasr Isfahani B, Moghim S. Genetic Characterization of blaSHV/VEB/PER Genes in ESBL-producing MDR *Klebsiella Pneumonia* Strains Isolated from Patients in Isfahan, Iran. Eur Online J Nat 2015; 4(1): 191-202.
18. Savari M, Rostami S, Ekrami A, Bahador A. Characterization of toxin-antitoxin (TA) systems in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Iran. Jundishapur J Microbiol 2016; 9(1).
19. Tahanasab Z, Mobasherizadeh S, Moghadampour M, Rezaei A, Maleki N, Faghri J. High Prevalence of Multiple Drug Resistance among ESBLs-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Hospitalized Patients in Isfahan, Iran. J Med Bacteriol 2016; 5(5-6): 29-38.
20. CLSI C. M100-S25: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 25th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
21. Gholami M, Hashemi A, Hakemi-Vala M, Goudarzi H, Hallajzadeh M. Efflux pump inhibitor phenylalanine-arginine B-naphthylamide effect on the minimum inhibitory concentration of imipenem in *Acinetobacter baumannii* strains isolated from hospitalized patients in Shahid Motahari burn hospital, Tehran, Iran. Jundishapur J Microbiol 2015; 8(10): e59912.
22. Cevahir N, Demir M, Kaleli I, Gurbuz M, Tikvesli S. Evaluation of biofilm production, gelatinase activity, and mannose-resistant hemagglutination in *Acinetobacter baumannii* strains. J Microbiol Immunol Infect 2008; 41(6): 513-518.
23. Tiwari S, Tomar R, Tripathi M, Ahuja A. Modified Protocol for Plant Genomic DNA Isolation. Indian Res J Genet & Biotech 2017; 9(4): 478-485.
24. Ghafourian S, Good L, Sekawi Z, Hamat RA, Soheili S, Sadeghifard N, et al. The mazEF toxin-antitoxin system as a novel antibacterial target in *Acinetobacter baumannii*. Mem Inst Oswaldo Cruz 2014; 109(4): 502-505.
25. Tsukayama D, Van Loon H, Cartwright C, Chmielewski B, Fluit A, Van der Werken C, et al. The evolution of *Pseudomonas aeruginosa* during antibiotic rotation in a medical intensive care unit: the RADAR-trial. Int J Antimicrob Agents 2004; 24(4): 339-345.
26. 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): 351-353.
27. Safari M, Nejad ASM, Bahador A, Jafari R, Alikhani MY. Prevalence of ESBL and MBL encoding genes in *Acinetobacter baumannii* strains isolated from patients of intensive care units (ICU). Saudi J Biol Sci 2015; 22(4): 424-429.
28. Mirsalehian A, Feyzabadi M, Akbari NF, Jabal AF, Goli H. Prevalence of extended spectrum beta lactamases among strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. Tehran Univ Med J 2008; 66(5): 333-337.

29. Hosseini N, Pourhajibagher M, Chiniforush N, Hosseinkhan N, Rezaie P, Bahador A. Modulation of Toxin-Antitoxin System Rnl AB Type II in Phage-Resistant Gammaproteobacteria Surviving Photodynamic Treatment. *J Lasers Med Sci* 2019; 10(1): 21-28.
30. El Maghraby HM, Mohammed HA. Detection of Toxin-Antitoxin System in *Acinetobacter baumannii* Isolated from Patients at Zagazig University Hospitals. *Egypt J Med Microbiol* 2018; 27(4): 81-86.
31. Coskun USS, Kilinc C, Guckan R, Dagcioglu Y, Demir O, Sandalli C. Effect of mazEF, higBA and relBE toxin-antitoxin systems on antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus* isolates. *Malawi Med J* 2018; 30(2): 67.