



## ارزیابی جهش در ژن *oprD* و مقاومت به ایمنی پنم در جدایه های سودوموناس آئروژینوسا در استان گیلان

حسین مطهری طشی<sup>۱</sup>، نجمه رنجی<sup>۲\*</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، <sup>۲</sup> استادیار، گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت.

### چکیده

**سابقه و هدف:** سودوموناس آئروژینوسا یک پاتوژن فرصت طلب گرم منفی و یکی از عوامل مرگ و میر عفونت های بیمارستانی به خصوص در بیماران با سوختگی های شدید می باشد. یکی از مکانیسم های مقاومت دارویی در سودوموناس آئروژینوسا، جهش و یا کاهش بیان ژن *oprD* می باشد. این مطالعه با هدف بررسی جهش های ژن *oprD* در جدایه های سودوموناس آئروژینوسا مقاوم به ایمنی پنم در استان گیلان انجام شد.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه مقطعی، تعداد ۴۵ سویه سودوموناس آئروژینوسا از نمونه های بالینی از بیمارستان ها و آزمایشگاه های شهر رشت و لاهیجان جداسازی گردید. مقاومت و حساسیت سویه ها نسبت به آنتی بیوتیک با روش های کربی باوئر (Kirby Bauer) و حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) تعیین گردید. سپس به منظور ارزیابی جهش در ژن *oprD* در جدایه های مقاوم به ایمنی پنم، از روش واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR) و توالی یابی استفاده شد. **یافته ها:** در این مطالعه در مجموع ۴۴/۴ درصد جدایه ها مقاوم به ایمنی پنم بودند. بالاترین میزان مقاومت در غلظت ۵۱۲ میکروگرم در میلی لیتر ایمنی پنم مشاهده گردید. همچنین توالی یابی نشان داد که ۵ جدایه دارای جهش های اشتباه T103S و K115T در ژن *oprD* بودند. همچنین جهش های خاموش L92L در ۷ نمونه، S100S در ۷ نمونه، P116P در ۵ نمونه و G151G در ۳ نمونه شناسایی شد.

**نتیجه گیری:** از آنجایی که *oprD* در ورود ایمنی پنم به سلول نقش دارد، بنابراین ایجاد جهش در این ژن می تواند دلیل مقاومت جدایه های سودوموناس آئروژینوسا نسبت به ایمنی پنم باشد. همچنین ممکن است جهش در *oprD* باعث تغییر تمایل به ایمنی پنم در برخی از جدایه ها شود.

**واژگان کلیدی:** ایمنی پنم، ژن *oprD*، واکنش زنجیره ای پلی مرز، سودوموناس آئروژینوسا.

پذیرش برای چاپ: آذر ماه ۹۵

دریافت مقاله: مهر ماه ۹۵

### مقدمه

بیماری زای بیمارستانی است که از طریق مکانیسم های ذاتی و نیز کسب عوامل مقاومت، می تواند نسبت به عوامل متعدد ضدمیکروبی ایجاد مقاومت نماید (۲). سودوموناس آئروژینوسا به عنوان یک باکتری گرم منفی و بیماری زای فرصت طلب، توانایی زیستن در تمام محیط ها را داشته و عامل بسیاری از عفونت ها در انسان همچون اندوکاردیت، مننژیت، سپتی سمی و عفونت های مزمن ریه در بیماران سیستمیک فیبروزیس

ظهور و گسترش مقاومت های ضد میکروبی باعث مشکلات درمانی جدی در محیط های بیمارستانی شده، که با میزان مرگ و میر بالا در افراد آلوده همراه است (۱). سودوموناس آئروژینوسا (*Pseudomonas aeruginosa*) یکی از عوامل

(\* آدرس برای مکاتبه: رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رشت، گروه زیست شناسی.

پست الکترونیک: n\_ranji@iaurasht.ac.ir

تلفن: ۰۱۳۳۳۴۲۴۰۸۰

از عفونت‌ها به ویژه در سوختگی‌ها، مبتلایان به سرطان و سیستمیک فیبروزیس، لازم است اطلاعات کامل و جامعی از مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در جمعیت تحت درمان داشته باشیم. با توجه به این که در مناطق مختلف جغرافیایی میزان و نوع جهش‌های ایجادکننده مقاومت در عوامل عفونی متفاوت می‌باشد، بنابراین بررسی نوع جهش‌های موثر در ایجاد مقاومت در سودوموناس آئروژینوسا در هر منطقه حائز اهمیت می‌باشد. هدف از این مطالعه شناسایی جهش‌های ژن *oprD* به عنوان یکی از عوامل ایجادکننده مقاومت نسبت به ایمنی پنم در نمونه‌های سودوموناس آئروژینوسا در استان گیلان بود.

### مواد و روش‌ها

**الف) جمع‌آوری نمونه و شناسایی باکتری:** در این مطالعه مقطعی تعداد ۱۲۰ جدایه مشکوک به سودوموناس آئروژینوسا در بازه زمانی یک ساله ۹۳-۹۴ از نمونه‌های بالینی از بیمارستان‌های سوانح و سوختگی ولایت، قائم و رازی شهر رشت، همچنین آزمایشگاه‌های مهر و رازی لاهیجان جمع‌آوری گردید. جدایه‌ها بر اساس رنگ آمیزی گرم، تست اکسیداز، تولید رنگدانه و رشد در محیط کشت مک‌کانکی و رشد در دمای  $42^{\circ}\text{C}$  مورد بررسی قرار گرفتند.

**ب) سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی:** برای ارزیابی حساسیت یا مقاومت جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ایمنی پنم ( $10\ \mu\text{g}$ ) جتتامایسین ( $10\ \mu\text{g}$ )، آمیکاسین ( $30\ \mu\text{g}$ )، سیپروفلوکساسین ( $5\ \mu\text{g}$ )، آمپی‌سیلین ( $10\ \mu\text{g}$ ) و سفتازیدیم ( $10\ \mu\text{g}$ ) (High Media، هند) از روش کربی باوئر و مطابق با استاندارد CLSI استفاده شد ( $10$ ). پس از ۱۸ تا ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای  $37^{\circ}\text{C}$ ، قطر هاله عدم رشد اطراف هر دیسک اندازه‌گیری و نتایج آن ثبت گردید.

**ج) تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC):** برای این منظور از آنتی‌بیوتیک‌های ایمنی پنم، سیپروفلوکساسین و سفتازیدیم و روش برات دابلوشن مطابق استاندارد CLSI استفاده گردید ( $10$ ). جدایه‌های سودوموناس آئروژینوسا در محیط کشت مولر هیتون برات (Quelab، کانادا) در غلظت‌های

می‌باشد (۳). افزایش شیوع عفونت‌های بیمارستانی به وسیله سودوموناس آئروژینوسای مقاوم به چند دارو، انتخاب درمان‌های مناسب را به شدت با مشکل مواجه کرده است (۲). اگر چه کاربایم‌ها از آنتی‌بیوتیک‌های موثر در درمان عفونت‌های سودوموناس آئروژینوسای مقاوم به چند دارو می‌باشند، اما مقاومت به این گروه از آنتی‌بیوتیک‌ها در سرتاسر دنیا در حال گسترش است (۴). تا به امروز ۳ مکانیسم مقاومت نسبت به کاربایم‌ها شناسایی شده است: ۱- کاهش جریان کاربایم‌ها به دلیل تغییرات در بیان پورین‌های غشای خارجی (*oprD*)، ۲- کاربایم‌های آزاد شده از باکتری، ۳- افزایش بیان پمپ‌های افلاکس. کاهش بیان پروتئین *oprD* در ایجاد مقاومت نسبت به ایمنی پنم در سودوموناس آئروژینوسا نقش دارد. این در حالی است که افزایش بیان پمپ‌های افلاکس به همراه کاهش بیان *oprD* باعث مقاومت بالای سودوموناس آئروژینوسا نه تنها به ایمنی پنم، بلکه نسبت به مروپنم و دوری پنم نیز می‌گردد (۵). یکی از مکانیسم‌های مقاومت به کاربایم‌ها در سویه‌های سودوموناس آئروژینوسا جهش و یا وجود عناصر الحاقی در پروتئین غشای خارجی (Opr) می‌باشد که نتیجه آن کاهش بیان یا غیرفعال شدن این پورین است (۶). OprD یک پورین غشاء سیتوپلاسمی سودوموناس آئروژینوسا است. در مطالعات ساختاری مشخص شده است که حلقه ۲ و ۳ پروتئین OprD محل ورود ایمنی پنم و همچنین محل اتصال آن است. بنابراین جهش و تغییر در حلقه ۲ و ۳ می‌تواند باعث تغییرات ساختاری و مقاومت باکتری نسبت به کاربایم‌ها شود (۷). جهش‌هایی که سبب غیرفعال شدن OprD می‌شوند، بیشتر باعث مقاومت به ایمنی پنم و به میزان کمتری به مروپنم و دوری پنم می‌گردند (۸). برای درمان عفونت‌های سودوموناس آئروژینوسا به نظر می‌رسد که استفاده از چندین آنتی‌بیوتیک مؤثرتر باشد (۹). چرا که سویه‌ها به سرعت به انواعی از آنها مقاوم می‌شوند و درمان این گروه از عفونت‌ها را با مشکل مواجه می‌کنند.

برای درمان مناسب و جلوگیری از مرگ و میر افراد با این گروه

دنیای میکروب‌ها، سال دهم، شماره اول بهار ۱۳۹۶. ارزیابی جهش در ژن *oprD* و مقاومت به ایمنی پنم در جدایه های سودوموناس آئروژینوسا در استان گیلان. حسین مطهری طشی و همکاران

PCR با طول تقریبی ۱۴۱۲ جفت باز، برای تعیین توالی توسط شرکت تکاپوزیست (تهران، ایران) به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال گردیدند. نتایج حاصل از توالی یابی به کمک نرم افزار CLC main workbench v3.5 و نرم افزار آنالیز بلاست (BLAST) از نظر وجود جهش در نمونه های مقاوم در مقایسه با نمونه استاندارد مرجع (PAO1) موجود در سایت NCBI مورد بررسی قرار گرفت. (و) آزمون آماری: تجزیه و تحلیل آماری داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون آماری مربع کای انجام گردید. مرز معنی داری در  $P < 0/05$  قرار داده شد.

#### یافته ها

در این مطالعه ۴۵ جدایه از ۱۲۰ جدایه، سودوموناس آئروژینوسا تشخیص داده شد. این نمونه ها شامل ۲۴ نمونه ادرار، ۱۴ نمونه سوختگی، ۶ نمونه ترشحات تنفسی و ۱ نمونه نکروز بافتی بودند. در این بین ۲۸ بیمار (۶۲/۲ درصد) زن و ۱۷ بیمار (۳۷/۸ درصد) مرد بودند. محدوده سنی بیماران ۲۰ ماهه تا ۸۵ سال بود و میانگین سنی آنها ۵۱/۴ سال تعیین گردید.

نتایج حاصل از آزمون تعیین حساسیت این باکتری نسبت به شش آنتی بیوتیک به روش کربی باوئر (انتشار از دیسک) در جدول ۱ نشان داده شده است. در این آزمون از ۴۵ نمونه مورد بررسی بیشترین میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های آمپی سیلین (۱۰۰ درصد) و سفتازیدیم (۶۰ درصد) بود. همچنین کمترین میزان مقاومت در

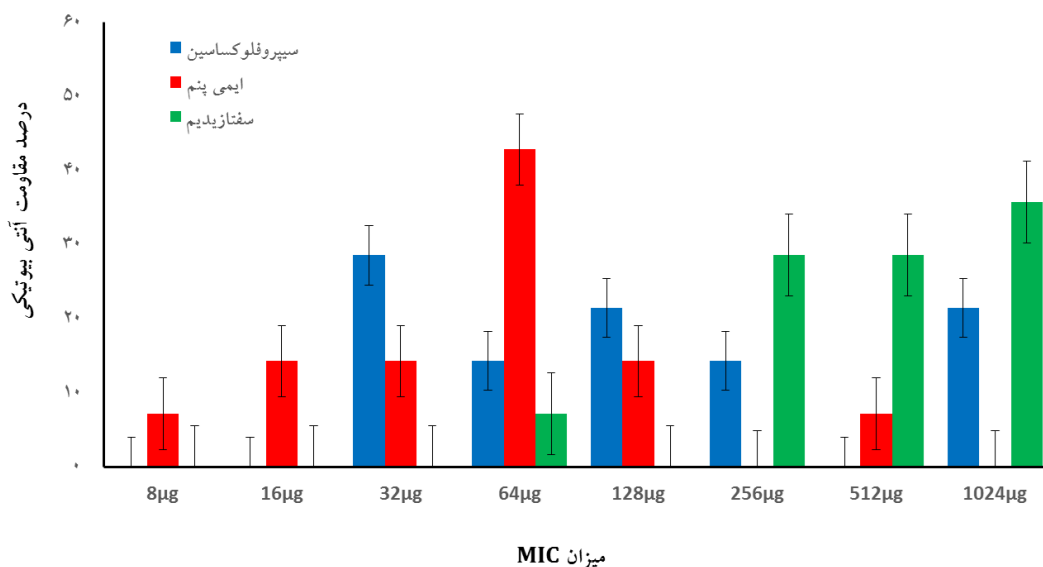
مختلف دارو کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه  $37^{\circ}\text{C}$  نگهداری شدند. سپس اولین لوله ای که کدورت قابل مشاهده نداشت و به عبارتی عدم رشد در آن دیده شد، به عنوان MIC در نظر گرفته شد.

د) استخراج DNA: جدایه های سودوموناس آئروژینوسا در محیط کشت مولر هینتون برات کشت داده شدند و به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  انکوبه شدند. سپس از کیت TOP General Genomic DNA Purification (شرکت توپازرن، ایران) برای استخراج DNA استفاده شد. نمونه های DNA استخراج شده، در ژل آگاروز ۱/۵ درصد مورد بررسی قرار گرفتند. ه) واکنش PCR و تعیین توالی ژن *oprD* برای این منظور از پرایمرهایی با توالی های F: 5'-CGCCGACAAGAAGAACTAGC-3' و R: 5'-GTCGATTACAGGATCGACAG-3' استفاده شد (۱۱ و ۱۲). واکنش PCR در حجم نهایی  $25\ \mu\text{l}$  با استفاده از کیت AccuPower® PCR PreMix (شرکت BIONEER، کره جنوبی) با افزودن DNA ژنومی، جفت پرایمر ( $20\ \mu\text{m}$ ) و آب استریل به محلول PreMix (حاوی آنزیم، کوفاکتور و بافر مخصوص) انجام شد. واکنش PCR با استفاده از ترموسایکلر Analaytik Jena طبق برنامه ذیل انجام شد: یک مرحله واسرشت شدن ابتدایی در  $94^{\circ}\text{C}$  به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل به ترتیب در دمای  $94^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱ دقیقه،  $60^{\circ}\text{C}$  به مدت ۳۰ ثانیه و  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱/۵ دقیقه و یک مرحله گسترش نهایی در دمای  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت ۷ دقیقه (۱۳). محصولات

جدول ۱: ارزیابی حساسیت آنتی بیوتیکی سویه های سودوموناس آئروژینوسا بر اساس روش CLSI.

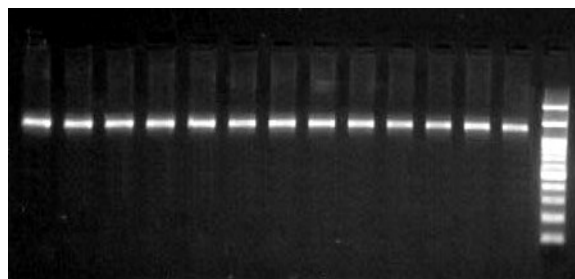
نام	تعداد نمونه های حساس (درصد)			تعداد نمونه های نیمه حساس (درصد)			تعداد نمونه های مقاوم (درصد)		
	سوختگی	ادرار	ترشحات تنفسی	سوختگی	ادرار	ترشحات تنفسی	سوختگی	ادرار	ترشحات تنفسی
سیپروفلوکساسین	۴(۸/۹)	۲۱(۴۶/۷)	۲(۴/۴)	۱(۲/۲)	۲(۴/۴)	۰	۹(۲۰)	۰	۴(۸/۹)
آمیکاسین	۳(۶/۷)	۲۱(۴۶/۷)	۵(۱۱/۱)	۰	۰	۰	۰	۱(۲/۲)	۰
ایمی پنم	۲(۴/۴)	۱۸(۴۰)	۲(۴/۴)	۱(۲/۲)	۲(۴/۴)	۰	۰	۰	۴(۸/۹)
سفتازیدیم	۲(۲/۲)	۲(۲/۲)	۰	۵(۱۱/۱)	۱۳(۲۸/۹)	۰	۰	۰	۰
جنتامیسین	۳(۶/۷)	۱۴(۳۱/۱)	۳(۶/۷)	۰	۰	۰	۰	۰	۰
آمپی سیلین	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۶(۱۳/۳)

دنیای میکروب‌ها، سال دهم، شماره اول بهار ۱۳۹۶. ارزیابی جهش در ژن *oprD* و مقاومت به ایمی پنم در جدایه های سودوموناس آئروژینوسا در استان گیلان. حسین مطهری طشی و همکاران



نمودار ۱: میزان MIC در نمونه های سودوموناس آئروژینوسای مقاوم به سیپروفلوکساسین، ایمی پنم و سفنازیدیم.

(شکل ۱). پس از توالی یابی مشخص گردید که از مجموع ۲۰ نمونه، پنج نمونه دارای جهش T103S بودند که در کدون ACC(Thr)>AGC(Ser)، آمینو اسید ترئونین به سرین تبدیل شده بود. در اثر جهش اشتباه تغییر C به G در باز شماره ۳۰۸ این ژن رخ داده بود (شکل ۲). همچنین هر ۵ نمونه دارای جهش اشتباه K115T نیز بودند که در کدون آمینو اسید لیزین به ترئونین AAG(Lys)>ACG(Thr) تبدیل شده بود. دلیل آن تغییر باز A به G در باز شماره ۳۴۴ ژن بود (شکل ۳). همچنین جهش های خاموش L92L در ۷ نمونه، S100S در ۷ نمونه، P116P در ۵ نمونه و G151G در ۳ نمونه شناسایی شد.

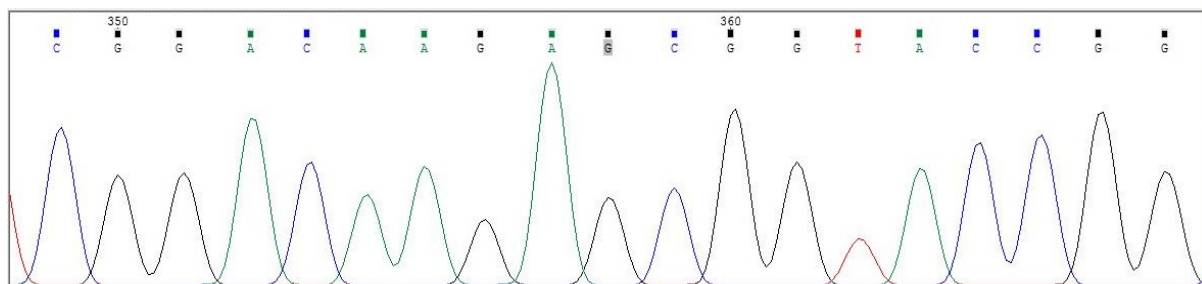


شکل ۱: نتایج الکتروفورز حاصل از تکثیر ژن *oprD* با روش PCR. ستون ۱) مارکر ۱۰۰ جفت بازی، بقیه ستون ها) قطعات با طول ۱۴۱۲ جفت باز مربوط به تکثیر ژن *oprD* در جدایه های مورد مطالعه.

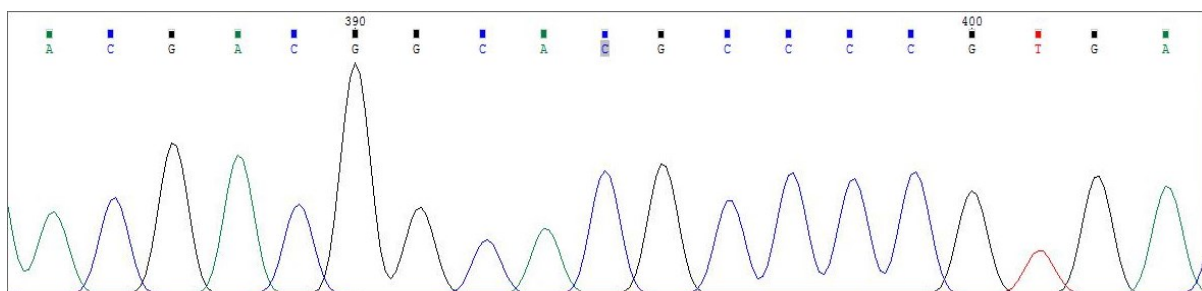
آنتی بیوتیک های سیپروفلوکساسین (۳۱/۱ درصد)، آمیکاسین (۳۱/۱ درصد)، جنتامایسین (۴۴/۴ درصد) و ایمی پنم (۴۴/۴ درصد) مشاهده گردید. نتایج MIC نشان داد که تعداد ۱۷ نمونه (۳۷/۷ درصد) مقاوم به سیپروفلوکساسین و ۲۰ نمونه (۴۵ درصد) مقاوم به ایمی پنم و ۲۷ نمونه (۶۰ درصد) مقاوم به سفنازیدیم بودند. در این مطالعه بالاترین میزان مقاومت به ایمی پنم MIC= ۵۱۲ µg/ml و کمترین میزان آن MIC= ۸ µg/ml تعیین شد. بالاترین میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین MIC= ۱۰۲۴ µg/ml و کمترین میزان آن MIC= ۳۲ µg/ml گزارش گردید. بالاترین میزان مقاومت به سفنازیدیم MIC= ۱۰۲۴ µg/ml و کمترین میزان آن MIC= ۶۴ µg/ml تعیین شد (نمودار ۱). در ۱۴/۳ درصد از نمونه ها مقاومت به ایمی پنم با MIC= ۱۲۸ µg/ml و در ۷/۱ درصد مقاومت با MIC= ۸ µg/ml گزارش شد.

در حالی که در ۳۵/۷ درصد موارد مقاومت به سفنازیدیم با MIC= ۱۰۲۴ µg/ml و در ۷/۱ درصد موارد MIC= ۶۴ µg/ml بود. اما MIC سیپروفلوکساسین در ۲۱/۴ درصد از نمونه ها MIC= ۱۰۲۴ µg/ml و در ۲۸/۶ درصد از نمونه ها MIC= ۳۲ µg/ml بود. به منظور بررسی مولکولی مقاومت به ایمی پنم، ژن *oprD* در نمونه های جدا شده با روش PCR تکثیر گردید

دنیای میکروبیها، سال دهم، شماره اول بهار ۱۳۹۶. ارزیابی جهش در ژن *oprD* و مقاومت به ایمنی پنم در جدایه های سودوموناس آئروژینوسا در استان گیلان. حسین مطهری طشی و همکاران



شکل ۲: الکتروفورگرام مربوط به تغییر باز C در موقعیت شماره ۳۰۸ به باز G. با تغییر ACC(Thr)>AGC(Ser) و تغییر آمینواسیدی T103S در ژن *oprD*.



شکل ۳: الکتروفورگرام مربوط به تغییر باز A در موقعیت شماره ۳۴۴ به باز G. با تغییر AAG(Lys)>ACG(Thr) و تغییر آمینواسیدی K115T در ژن

## بحث

بدمعنی T103S و K115T در ژن *oprD* می باشند. در مطالعه فاضلی (Fazeli) و همکاران بین سال های ۲۰۱۲ تا ۲۰۱۳ در اصفهان از ۶۵ جدایه سودوموناس آئروژینوسا ۳۸/۵ درصد نمونه های ادراری، ۲۹/۲ درصد نمونه های ترشحات نای، ۱۰/۸ درصد نمونه های خون، ۷/۶ درصد نمونه های زخم و بقیه از نمونه های برونش، مایع مغزی نخاعی، آبسه و مایع شکمی بود (۱۵).

در مطالعه حسینی پور (Hosseini Pour) و همکاران در سال های ۲۰۱۴ تا ۲۰۱۵ در اهواز از ۵۱ جدایه سودوموناس آئروژینوسا تعداد ۱۸ جدایه از زخم های عفونی، ۵ جدایه از عفونت های تنفسی، ۷ جدایه از عفونت ادراری، ۸ جدایه از زخم بستر و ۱۳ جدایه از سوختگی بود (۱۶).

در مطالعه معمار (Memar) و همکاران در سال ۲۰۱۵ در تبریز از ۹۰ جدایه سودوموناس آئروژینوسا ۳۱/۱٪ نمونه زخم، ۲۴/۴٪ نمونه خون، ۱۷/۸٪ نمونه ادرار، ۱۸/۹٪ نمونه نای و ۷/۸٪ نمونه صفاق بود (۱۷). در مطالعه ای که توسط ضافر (Zafer) و همکاران در سال ۲۰۱۵ در مصر انجام شد، از ۴۸ جدایه سودوموناس آئروژینوسا ۲۱ نمونه از زخم، ۱۲ نمونه از

سودوموناس آئروژینوسا به دلیل مقاومت به انواع آنتی بیوتیک ها، یک باکتری بیماری زای بیمارستانی مهم محسوب می شود. از مکانیسم های مقاومت این باکتری نسبت به انواع مختلف آنتی بیوتیک ها می توان به نفوذپذیری کم غشا، کسب آنزیم های تغییر دهنده ساختار آنتی بیوتیک، جهش در آنزیم های هدف آنتی بیوتیک ها و افزایش بیان پمپ های افلاکس چند دارویی اشاره نمود (۱۴).

با توجه به سرعت بالای این باکتری بیماری زا در کسب مقاومت از طریق انتقال افقی و یا جهش های ژنی، لازم است روش های مناسبی در راستای شناسایی انواع مقاوم در بیمارستان ها مورد استفاده قرار داد تا با انتخاب داروهای جایگزین مناسب، درمان افراد مبتلا با موفقیت بیشتری همراه باشد.

در این مطالعه از مجموع ۴۵ جدایه سودوموناس آئروژینوسا جداسازی شده از مراکز درمانی و تشخیصی شهرهای رشت و لاهیجان، ۲۰ جدایه مقاوم به ایمنی پنم بودند. با روش توالی یابی مستقیم مشخص گردید که ۵ جدایه دارای جهش های

نشان دهنده افزایش مقاومت دارویی در سال های اخیر باشد. در تحقیقی که توسط معمار (Memar) و همکاران در سال ۲۰۱۵ در تبریز انجام شد، از ۹۰ جدایه سودوموناس آئروژینوسا، الگوی مقاومت به روش دیسک دیفیوژن برای آنتی بیوتیک ایمنی پنم ۲/۴۲٪ بود (۱۷). در مطالعه کاتائوکا (Kataoka) و همکاران در ۴۷ سویه سودوموناس آئروژینوسا مقاومت نسبت به ایمنی پنم ۱۰۰ درصد گزارش گردید (۲۲). در مطالعه راجت (Rajat) و همکاران در سال ۲۰۱۵ در هند از ۱۰۰ جدایه سودوموناس آئروژینوسا میزان مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به ایمنی پنم ۱۴٪، سفنازیدیم ۴۳٪ و سیپروفلوکساسین ۴۹٪ بود (۲۳). در مطالعه لی (Lee) و کو (Ko) در سال ۲۰۱۲ بر روی ۲۱۳ جدایه سودوموناس آئروژینوسا جدا شده از ۱۰ بیمارستان کره جنوبی، در ۲۳ درصد نمونه ها مقاومت به ایمنی پنم گزارش شد (۴). همچنین در مطالعه نیکوکار (Nikokar) و همکاران در سال های ۲۰۱۰ تا ۲۰۱۱ در گیلان موثرترین آنتی بیوتیک، ایمنی پنم با میزان مقاومت ۳/۲۳ درصد گزارش گردید. در حالی که در مطالعه حاضر مقاومت به ایمنی پنم ۴/۴۴ درصد مشاهده شد که مشابه با مطالعه معمار و همکاران در تبریز بود. اما نسبت به مطالعات اصفهان و کرمانشاه و خارج از کشور (ژاپن و کره جنوبی) به نظر می رسد که نرخ مقاومت به ایمنی پنم در درجه پایین تری قرار دارد. اما نسبت به مطالعه نیکوکار (Nikokar) و همکاران در گیلان که تنها بر روی نمونه های سوختگی صورت گرفته بود، ممکن است افزایش مقاومت در مطالعه حاضر، نتیجه مصرف بی رویه این آنتی بیوتیک در عفونت های با مواضع بافتی مختلف باشد. قابل توجه است که بیشترین درصد مقاومت به ایمنی پنم نیز، در نمونه های سوختگی در مطالعه حاضر مشاهده شده است. اوکامپو-سوسا (Ocampo-Sosa) و همکاران در سال ۲۰۱۲ در اسپانیا وجود انواع جهش *oprD* را در ۶۰ سویه بتالاکتاماز منفی مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه جهش های اشتباه به ویژه P<sub>186</sub>G, E<sub>185</sub>Q, R<sub>310</sub>E, A<sub>315</sub>G, T<sub>103</sub>S, K<sub>115</sub>T, F<sub>170</sub>L

اداران، ۹ نمونه از خلط، ۴ نمونه از خون و ۲ نمونه از سواب گوش جدا شد (۱۸). در مطالعه حاضر نیز تنوع در موضع عفونت همانند دیگر مطالعات مشاهده شد که بیشترین آنها از نمونه های ادراری جدا گردید. از سوی دیگر در مطالعه سلیمی (Salimi) و همکاران در سال ۲۰۰۸ در کرمانشاه از ۶۰ جدایه سودوموناس آئروژینوسای مورد بررسی، میزان مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به سفنازیدیم ۷۰٪ و ایمنی پنم ۳/۷۳٪ بود (۱۹). در مطالعه نیکوکار (Nikokar) و همکاران در سال های ۲۰۱۰ تا ۲۰۱۱ در گیلان، از مجموع ۱۸۲ بیمار بستری در بخش سوختگی، ۸۶ جدایه سودوموناس آئروژینوسا به دست آمد. میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های سفنازیدیم ۶۸/۸ درصد، سیپروفلوکساسین ۳/۶۶ درصد، آمیکاسین ۸/۴۸ درصد و جنتامایسین ۲/۳۷ درصد مشاهده شد (۲۰). در مطالعه همتی (Hemmati) و همکاران در زنجان از ۱۲۰ جدایه سودوموناس آئروژینوسا، بیشترین و کمترین میزان مقاومت به ترتیب مربوط به سفوتاکسیم (۳/۴۳٪) و آمیکاسین (۶/۲۶٪) گزارش شد (۲۱). در مقایسه با مطالعه سلیمی (Salimi) و همکاران، به نظر می رسد که مقاومت نسبت به سفنازیدیم و ایمنی پنم در استان گیلان رشد کمتری طی سال های اخیر داشته است. همچنین نتایج این مطالعه نشان می دهد که مقاومت به انواع آنتی بیوتیک در این تحقیق نسبت به مطالعه فاضلی (Fazeli) و همکاران دارای نرخ کمتری بوده است. با این وجود نرخ مقاومت به سفنازیدیم در سال های اخیر در گیلان به نرخ مقاومت به آن در اصفهان در سال های پیش نزدیک بوده است. این نتیجه نیز نشان دهنده نرخ پایین تر مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های مورد مطالعه در گیلان است. در مطالعه نیکوکار (Nikokar) و همکاران در استان گیلان تنها موارد سوختگی گزارش شده که می تواند درصد مقاومت بیشتری نسبت به دیگر موارد عفونی از این باکتری داشته باشد. همچنین تفاوت مقاومت به آنتی بیوتیک ها در مطالعه حاضر با مطالعه همتی (Hemmati) و همکاران در زنجان می تواند

در سال ۲۰۱۴ فاضلی (Fazeli) و همکاران مکانیسم اصلی مقاومت به کارباینم ها را غیرفعال شدن جهشی ژن *oprD* ذکر کردند. جهش های E185Q, P186G و V189T در برخی نمونه ها در ژن *oprD* گزارش گردید (۱۵).

در مطالعه حاضر نیز جهش های T103S, K115T در ژن *oprD* در چندین جدایه مقاوم رخ داد. این امر ممکن است همانند مطالعات قبلی از علل ایجاد کننده مقاومت به ایمنی پنم در این جدایه ها باشد. با توجه به اینکه در مطالعات قبلی تغییراتی مانند جهش های T103S و K115T باعث تغییر در ساختار پروتئین و در نتیجه تغییر در عملکرد *oprD* در سلول می شود، به نظر می رسد این جهش ها بتوانند در ایجاد مقاومت به ایمنی پنم در استان گیلان نقش داشته باشند.

شایان یادآوری است که جهش های کدون های ۱۰۳ و ۱۱۵ می تواند با تغییر در ساختار L4 و L6 تغییر در عملکرد پورین و در نتیجه مقاومت به ایمنی پنم را به دنبال داشته باشد. اما برای تایید این مساله نیاز به مطالعات بیوانفورماتیکی و آنالیز آزمایشگاهی وجود دارد.

### نتیجه گیری

مطالعه حاضر نشان می دهد که میزان مقاومت به انواع آنتی بیوتیک ها در جدایه های سودوموناس آئروژینوسا در حال افزایش است. به طوری که مقاومت صددرصدی به آمپی سیلین ناکارآمدی این دارو را در درمان بیان می کند.

همچنین درصد بالای مقاومت به جنتامایسین به عنوان یک داروی تزریقی، خطر بی تأثیر شدن این دارو را در آینده در پی خواهد داشت. از سوی دیگر به دلیل جهش پذیری بالای ژن *oprD* و وقوع جهش های تغییر دهنده ساختار *oprD* در جدایه های سودوموناس آئروژینوسا، به نظر می رسد که افزایش مقاومت به ایمنی پنم در استان گیلان در حال افزایش باشد. از این رو به منظور درمان مؤثرتر عفونت های بیمارستانی، لازم است دلایل ایجاد کننده مقاومت به انواع آنتی بیوتیک ها در هر استان شناسایی و داروهای مناسب تری جایگزین گردد.

V189T, *oprD* شناسایی شد. جهش های اشتباه T103S و K115T سبب تغییر ساختار در L4 و *oprD* L6 می شود و بر فعالیت آن اثر می گذارد (۶).

لیو (Liu) و همکاران در سال ۲۰۱۳، برای نخستین بار به بررسی ترکیبی از مکانیسم های مقاومت کارباینم در جدایه های بالینی سودوموناس آئروژینوسا تولیدکننده بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBLs) پرداختند. آنها ترکیب چند مکانیسم ناشی از جهش منجر به غیرفعال سازی *oprD* و بیان بیش از حد سیستم های افلاکس را مکانیسم اصلی مقاومت کرباینم در میان جدایه های سودوموناس آئروژینوسا تولیدکننده ESBLs شناسایی کردند. در این مطالعه جهش های *oprD* از جمله T103S (نمونه ۵)، K115T (نمونه ۴) شناسایی شد. همچنین در دو نمونه هر دو جهش T103S و K115T گزارش گردید (۲۴).

در سال ۲۰۱۵ کیم (Kim) و همکاران در کره جنوبی، علت نفوذپذیری کم داروها را غیرفعال شدن جهشی *oprD* در جدایه های سودوموناس آئروژینوسای مقاوم به کارباینم ها گزارش کردند. در نمونه های مورد مطالعه آنها، دو نمونه جهش اشتباه T103S, K115T در ژن *oprD* مشاهده شد (۱).

در سال ۲۰۱۶ کائو (Kao) و همکاران به بررسی مکانیسم های مقاومت در سویه های سودوموناس آئروژینوسای مقاوم به ایمنی پنم جدا شده از خون در تایوان پرداختند. این مطالعه نشان داد که تغییر در پروتئین *oprD* و افزایش بیان پمپ افلاکس، دلیل اصلی مقاومت به ایمنی پنم می باشند. از دیگر علل ایجاد مقاومت به ایمنی پنم افزایش بیان *ampC*, ESACs و وجود ژن های  $\beta$ -لاکتاماز از نوع VIM و OXA در جدایه های سودوموناس آئروژینوسا در تایوان بود.

در این مطالعه در ۱۹ جدایه سودوموناس آئروژینوسا جهش ها از نوع جایگزینی آمینو اسیدی در ژن *oprD* به ویژه T103S, MIC E185Q و K115T, V127L, F170L بود که محدوده برای ایمنی پنم ۱۶ تا ۲۵۶ میکروگرم بر میلی تعیین شد. بیشترین فراوانی مربوط به MIC برابر با ۳۲ میکروگرم بر میلی لیتر گزارش گردید (۲۵).

**تشکر و قدردانی**

پرسنل بیمارستان های ولایت، قائم و رازی و نیز آزمایشگاه های مهر و رازی لاهیجان، آشتیانی و رازی رشت و آقایان غلامرضا صفری، سبحان درویشی و سعید نادر محمد به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

این مقاله تحقیقاتی حاصل پایان نامه دانشجویی کارشناسی ارشد میکروب شناسی می باشد. نویسندگان این مقاله از معاون محترم پژوهشی و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، ریاست و

**References**

1. Kim CH, Kang HY, Kim BR, Jeon H, Lee YC, Lee SH, Lee JC. Mutational inactivation of OprD in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Korean hospitals. J Microbiol. 2016; 54(1): 44-49.
2. Fang Z-l, Zhang L-y, Huang Y-m, Qing Y, Cao K-y, Tian G-b, Huang X. OprD mutations and inactivation in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from China. Infect Genet Evol. 2014; 21: 124-128.
3. Dashtizadeh Y, Moattari A, Gorzin AA. Phenotypic and genetically evaluation of the prevalence of efflux pumps and antibiotic resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* among burned patients admitted to Ghotbodin Shirazi Hospital. J Microb World. 2014; 7(2): 118-127.
4. Lee J-Y, Ko KS. OprD mutations and inactivation, expression of efflux pumps and AmpC, and metallo- $\beta$ -lactamases in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from South Korea. Int J Antimicrob Agents. 2012; 40(2): 168-172.
5. Li H, Luo Y-F, Williams BJ, Blackwell TS, Xie C-M. Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: from antibiotic resistance to novel therapies. Int J Med Microbiol. 2012; 302(2): 63-68.
6. Ocampo-Sosa AA, Cabot G, Rodríguez C, Roman E, Tubau F, Macia MD, Moya B, Zamorano L, Suárez C, Peña C, Domínguez MA, Moncalián G, Oliver A, Martínez-Martínez L. Alterations of OprD in carbapenem-intermediate and-susceptible strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with bacteremia in a Spanish multicenter study. Antimicrob Agents Chemother. 2012; 56(4): 1703-1713.
7. Arabestani MR, Rajabpour M, Yousefi Mashouf R, Alikhani MY, Mousavi SM. Correlation between the expression of *oprD* gene and sensitivity to carbapenems of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical samples using qRT-PCR. Arak Univ Med Sci J 2015; 17(11): 70-79. [In Persian]
8. Motaghi N, Najafipour S. Outer membrane protein D gene in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and its role in antibiotic resistance. J Fasa Univ Med Sci. 2016; 5(4): 501-507. [In Persian]
9. Tamma PD, Cosgrove SE, Maragakis LL. Combination therapy for treatment of infections with gram-negative bacteria. Clin Microbiol Rev. 2012; 25(3): 450-470.



10. Cockerill F, Patel J, Alder J, Bradford P, Dudley M, Eliopoulos G, Hardy D, Hecht D, Hindler J, Powell M, Swenson J, Thomson R, Traczewski M, Turnidge J, Weinstein M, Zimmer B. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-third informational supplement; M100-S23: Clinical & Laboratory Standards Institute; 2013.
11. Rodríguez-Martínez J-M, Poirel L, Nordmann P. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53 (11): 4783-4788.
12. Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Domínguez MA, Gago JF, Juan C, Tubau F, Rodríguez C, Moyà B, Peña C, Martínez-Martínez L, Oliver A. Genetic markers of widespread extensively drug-resistant (XDR) *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2012; 56(12): 6349-6357.
13. Hakimi F, Ranji N, Faezi Ghasemi M. Mutations in *nalC* gene in ciprofloxacin resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitals and laboratories of Guilan province in 2014-2015 years. *Arak Univ Med Sci J*. 2016; 19(7): 12-21. [In Persian]
14. Tohidpour A, Najar Peerayeh S, Najafi S. Detection of DNA gyrase mutation and multidrug efflux pumps hyperactivity in ciprofloxacin resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol Infec Dis*. 2013; 1(1): 1-7.
15. Fazeli H, Solgi H, Havaei SA, Shokri D, Norouzi Barogh M, Zamani FZ. Carbapenem and fluoroquinolone resistance in multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Al-Zahra hospital, Isfahan, Iran. *J Med Microbiol Infec Dis*. 2014; 2(4): 147-152.
16. Hosseini Pour P, Momtaz H, Serajyan AA, Tajbakhsh E. Investigating class I, II and III integrons in multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospital infections in Ahvaz. *Int J Med Lab*. 2015; 2(3): 168-176.
17. Memar MY, Pormehrli R, Alizadeh N, Ghotaslou R, Bannazadeh Baghi H. Colistin, an option for treatment of multiple drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Physiol Pharmacol*. 2016; 20(2): 130-136.
18. Zafer MM, Al-Agamy MH, El-Mahallawy HA, Amin MA, Ashour SED. Dissemination of VIM-2 producing *Pseudomonas aeruginosa* ST233 at tertiary care hospitals in Egypt. *BMC Infect Dis*. 2015; 15(1): 1-7.
19. Salimi A, Akya A, Haidari E. Prevalence of  $\beta$ -lactamases genes of IMP, SHV and PER in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitals in Kermanshah. *J Clin Res Paramedical Sci*. 2015; 4(2): 152-159. [In Persian]
20. Nikokar I, Tishayar A, Flakiyan Z, Alijani K, Rehana-Banisaeed S, Hossinpour M. Antibiotic resistance and frequency of class 1 integrons among *Pseudomonas aeruginosa*, isolated from burn patients in Guilan, Iran. *Iran J Microbiol*. 2013; 5(1): 36-41.
21. Hemmati F, Soroori Zanjani R, Haghi F, Zeighami H. Determination of antibiotic resistance profile and frequency of Metallo-Beta-Lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *ZUMS Journal*. 2014; 22(93): 77-85. [In Persian]

22. Kataoka H, Ida T, Ishii Y, Tateda K, Oguri T, Yoshida A, Okuzumi K, Oishi T, Tsukahara M, Mori SI, Yoneyama A, Araoka H, Mitsuda T, Sumitomo M, Moriya K, Goto M, Nakamori Y, Shibayama A, Ohmagari N, Sato T, Yamaguchi K. Analysis of the influence of drug resistance factors on the efficacy of combinations of antibiotics for multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitals located in the suburbs of Kanto area, Japan. J Glob Antimicrob Resist. 2013; 1(2): 91-96.
23. Rajat RM, Patel ND, Pateliya UN, Katara RS. Clinical correlation of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical settings at Civil Hospital, Ahmedabad. Int Arch Integrated Med. 2015; 2(5): 5-9.
24. Liu Y, Li X-Y, Wan L-G, Jiang W-Y, Li F-Q, Yang J-H. Efflux system overexpression and decreased OprD contribute to the carbapenem resistance among extended-spectrum beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a Chinese university hospital. Microbial Drug Resistance. 2013; 19(6): 463-468.
25. Kao C-Y, Chen S-S, Hung K-H, Wu H-M, Hsueh P-R, Yan J-J, Wu J-J. Overproduction of active efflux pump and variations of OprD dominate in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with bloodstream infections in Taiwan. BMC Microbiol. 2016; 16(107): 1-8.



## Study on *oprD* mutation and imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Gilan province

Hossein Motahhary Tashi<sup>1</sup>, Najmeh Ranji<sup>2</sup>

<sup>1</sup> M.Sc. student, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Rasht branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.

<sup>2</sup> Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Rasht branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.

### Abstract

**Background & Objectives:** *Pseudomonas aeruginosa* is a Gram-negative opportunistic pathogen, and one of the mortality causes of nosocomial infections, specifically in patients with severe burns. One of the drug resistance mechanisms in *P. aeruginosa* is mutation or down-regulation of *oprD* gene. In this study, we investigated *oprD* mutations in imipenem-resistant *P. aeruginosa* isolates in Gilan province.

**Materials & Methods:** In this sectional study, 45 *P. aeruginosa* strains were isolated from different clinical samples of Rasht and Lahijan hospitals and laboratories. The antibiotic resistance and susceptibility of the strains were determined by Kirby Bauer and minimum inhibitory concentration (MIC) methods. Then, PCR and sequencing were performed to evaluate *oprD* mutation in imipenem-resistant isolates.

**Results:** 44.4% isolates were imipenem-resistant. The highest resistance was shown to 512 µg/ml of imipenem. Sequencing analysis showed that 5 isolates have T103S and K115T missense mutations in the *oprD* gene. Furthermore, silencing mutations including L92L were detected in 7 samples, S100S in 7 samples, P116P in 5 samples, and G151G in 3 samples.

**Conclusion:** Since *oprD* plays a major role in imipenem entry to the cell, *oprD* mutation can be the cause of imipenem resistance in *P. aeruginosa* isolates. Furthermore, the *oprD* mutation might have changed the affinity to imipenem in these isolates.

**Keywords:** Imipenem, *oprD* gene, PCR, *Pseudomonas aeruginosa*.

---

Correspondence to: Najmeh Ranji

Tel: +98 1333424080

E-mail: [n\\_ranji@iaurasht.ac.ir](mailto:n_ranji@iaurasht.ac.ir)

Journal of Microbial World 2017, 10(1): 26-36.