

## The Role of Insertion Sequence (IS) Elements in Inactivation of Outer Membrane Porin OprD and Resistance to Carbapenems among *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Strains in Ardabil

Nazari M<sup>1</sup>, Ahmadi H<sup>1</sup>, Vaez H<sup>2</sup>, Khademi F<sup>1\*</sup>

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

2. Department of Microbiology, School of Medicine, Zabol University of Medical Sciences, Zabol, Iran.

\* **Corresponding author.** Tel: +984533534684, Fax: +984533534684, E-mail: k\_farzad@yahoo.com, f.khademi@arums.ac.ir

Received: Apr 27, 2022 Accepted: May 17, 2022

### ABSTRACT

**Background & objectives:** Carbapenems are the main antibiotics for the treatment of infections caused by multidrug-resistant (MDR) *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). The aims of this study were to determine the prevalence of gene encoding outer membrane porin protein (OprD) in carbapenem-resistant *P. aeruginosa* strains as well as to assess the role of insertion sequence (IS) elements in the inactivation of OprD porin and the emergence of carbapenem resistance.

**Methods:** In this study, 103 clinical isolates of *P. aeruginosa* including 58, 42 and 23 strains resistant to imipenem, meropenem, and doripenem were used, respectively. The isolates were collected from patients referred to Ardabil hospitals. The presence of *oprD* gene and IS elements were investigated using polymerase chain reaction (PCR) and sequencing methods. *P. aeruginosa* PAO1 standard isolate was used as the positive control strain for *oprD* gene.

**Results:** The frequency of *oprD* gene among carbapenem-resistant *P. aeruginosa* strains isolated from Ardabil hospitals was 96.5%. Furthermore, IS elements were not observed in the investigated isolates.

**Conclusion:** Based on the results of this study, the presence of IS elements did not involve in the inactivation of outer membrane porin OprD and resistance to carbapenems among *P. aeruginosa* clinical strains in Ardabil. Therefore, an investigation of the role of other mutations in reducing the expression of *oprD* gene and increasing *P. aeruginosa* resistance to carbapenems is recommended.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*; Insertion Sequence; OprD

## نقش عناصر توالی الحاقی (IS) در غیرفعال کردن پورین غشای خارجی OprD و مقاومت به کاربایتم‌ها در سویه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا در اردبیل

مریم نظری<sup>۱</sup>، هادی احمدی<sup>۱</sup>، حمید واعظ<sup>۲</sup>، فرزاد خادمی<sup>۱\*</sup>

۱. گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

۲. گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زابل، زابل، ایران

\* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۴۵۳۳۵۳۴۶۸۴ فاکس: ۰۴۵۳۳۵۳۴۶۸۴ پست الکترونیک: k\_farzad@yahoo.com و f.khademi@arums.ac.ir

### چکیده

**زمینه و هدف:** کاربایتم‌ها آنتی بیوتیک‌های اصلی برای درمان عفونت‌های ناشی از سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به چند دارو (MDR) می‌باشند. هدف از این مطالعه، تعیین شیوع ژن کدکننده پروتئین پورین غشای خارجی (OprD) در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به کاربایتم‌ها و نیز بررسی نقش عناصر توالی الحاقی (IS) در غیرفعال کردن پورین OprD و پیدایش مقاومت به کاربایتم‌ها بود.

**روش کار:** در این مطالعه، از ۱۰۳ ایزوله بالینی سودوموناس آئروژینوزا (۵۸، ۲۳ و ۲۳ سویه که به ترتیب در برابر ایمپینم، مروپنم و دوریپنم مقاوم بودند) استفاده گردید. ایزوله‌ها از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان‌های شهر اردبیل جدا شده بودند. حضور ژن oprD و عناصر IS با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) و توالی یابی ژنی مورد بررسی قرار گرفت. سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا PAO1 به عنوان سویه کنترل مثبت ژن oprD مورد استفاده قرار گرفت. **یافته‌ها:** فراوانی ژن oprD در میان سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به کاربایتم‌ها جدا شده از بیمارستان‌های شهر اردبیل ۹۶/۵ درصد بود. همچنین، در هیچکدام از سویه‌های مورد بررسی عناصر IS مشاهده نشد.

**نتیجه گیری:** بر اساس نتایج این مطالعه، حضور عناصر IS در غیرفعال کردن پورین غشای خارجی OprD و مقاومت سویه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا به کاربایتم‌ها در اردبیل دخیل نیست. لذا، بررسی نقش دیگر موتاسیون‌ها در کاهش بیان ژن oprD و افزایش مقاومت سودوموناس آئروژینوزا به کاربایتم‌ها توصیه می‌شود.

**واژه‌های کلیدی:** سودوموناس آئروژینوزا، توالی الحاقی، OprD

دریافت: ۱۴۰۱/۲/۷ پذیرش: ۱۴۰۱/۲/۲۷

### مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا<sup>۱</sup> یک باسیل گرم منفی، هوازی اجباری، غیرتخمیری و اکسیداز، کاتالاز و اوره‌آز مثبت است. این پاتوژن فرصت طلب اغلب در محیط بیمارستان، به ویژه در بخش مراقبت‌های ویژه و بیمارانی که از وسایل پزشکی مانند ونتیلاتور و کاتتر

استفاده می‌کنند، یافت می‌شود و با طیف گسترده‌ای از عفونت‌های حاد و مزمن از جمله عفونت‌های ریوی، پوست و بافت نرم، دستگاه ادراری، چشم و گوش، باکتری می و اندوکاردیت مرتبط می‌باشد [۴-۱]. بر اساس گزارش سازمان‌های بین‌المللی مثل مرکز کنترل و پیشگیری از بیماری‌ها<sup>۲</sup> (CDC) و سازمان

<sup>۲</sup> Centers for Disease Control and Prevention

<sup>۱</sup> *Pseudomonas aeruginosa*

بهداشت جهانی<sup>۱</sup> (WHO)، مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری‌های گرم منفی و مثبت بطور مداوم در حال افزایش بوده و یک تهدید جدی علیه سلامت عمومی در سراسر جهان محسوب می‌شود [۳]. بطوری‌که درمان عفونت‌های ناشی از سودوموناس آئروژینوزا، بدلیل ظهور سویه‌های مقاوم به چند دارو<sup>۲</sup> (MDR)، را به برخی آنتی بیوتیک‌ها از جمله کارباپنم‌ها محدود کرده است [۳]. در حال حاضر، کارباپنم‌ها بعنوان آنتی بیوتیک‌های اصلی برای درمان عفونت‌های ناشی از سویه‌های MDR سودوموناس آئروژینوزا باقی مانده‌اند، اما ایجاد مقاومت در برابر این آنتی‌بیوتیک‌های موثر ممکن است کارایی آنها را بطور قابل توجهی به خطر اندازد [۵]. بر اساس گزارش سازمان جهانی بهداشت در سال ۲۰۱۷، پیدایش سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به کارباپنم‌ها تهدید جدیدی برای سلامت انسان به شمار می‌رود [۶]. بنابراین، آگاهی از شیوع منطقه‌ای سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به کارباپنم‌ها و نیز مکانیسم‌های مقاومت باکتریایی به این آنتی بیوتیک‌ها در کنترل عفونت‌های ناشی از این سویه‌های مقاوم و ممانعت از شکست درمان دارویی موثر خواهد بود. بر اساس یک مطالعه متا آنالیز، شیوع سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به ایمپنم و مروپنم در ایران به ترتیب ۳۱/۶ درصد و ۴۰ درصد می‌باشد [۶]. این درحالیست که مطالعه قبلی ما نشان داد شیوع سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به ایمپنم، مروپنم و دورپنم در شهر اردبیل به ترتیب ۶۶/۷ درصد، ۴۲/۹ درصد و ۳۳/۳ درصد می‌باشد [۲]. بر اساس مطالعات انجام‌شده، مقاومت سودوموناس آئروژینوزا به کارباپنم‌ها چند فاکتوری و وابسته به پلاسمید و کروموزوم بوده و شامل حضور آنزیم‌های

هیدرولیزکننده کارباپنم‌ها (عمدتاً متالو- $\beta$ -لاکتامازها<sup>۳</sup> (MBL)، افزایش تولید AmpC سفالوسپوریناز القایی کروموزومی، کاهش نفوذپذیری غشای خارجی از طریق تغییر یا کاهش تولید پورین غشای خارجی OprD و در نهایت حضور ایفلاکس پمپ‌های MexAB-OprM (کاهش اثر مروپنم)، و همچنین MexCD-OprJ و MexXY-OprM (کاهش اثر ایمپنم) می‌باشد [۵,۷,۸]. در میان این مکانیسم‌های مقاومت، نقش پورین غشای خارجی OprD در مقاومت سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا به کارباپنم‌ها جدا شده از نمونه‌های بالینی در شهر اردبیل مشخص نشده است. به طور کلی، کارباپنم‌ها، بدلیل کوچک و آبدوست بودن، می‌توانند به طور موثری از غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی عبور کنند. آنها با عبور از کانال آبی ارائه شده توسط پروتئین‌های پورین وارد سلول می‌شوند. پورین اصلی برای جذب کارباپنم‌ها در سودوموناس آئروژینوزا پورین OprD می‌باشد [۹]. لکن، جهش‌ها مانند جایگزینی نوکلئوتیدی، حذف و اضافه شدن حضور عناصر توالی الحاقی<sup>۴</sup> (IS) در ژن *oprD* یا ناحیه پروموتور آن می‌توانند باعث کاهش یا از بین رفتن تولید پورین غشای خارجی OprD شوند و در نتیجه حساسیت سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا به آنتی بیوتیک‌های کارباپنم را کاهش دهند [۷]. عناصر IS کوچکترین و پرشمارترین عناصر قابل انتقال مستقل<sup>۵</sup> (TE) می‌باشند که نقش مهمی در پیدایش برخی ویژگی‌های مهم در باکتری‌ها از جمله مقاومت در برابر عوامل ضد باکتریایی، بیماری‌زایی و متابولیسم دارند [۱۰]. بدلیل نامعلوم بودن شیوع ژن *oprD* و عناصر IS در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا در شهر اردبیل، هدف مطالعه حاضر، تأیید حضور ژن *oprD* در سویه‌های مقاوم به کارباپنم‌ها و همچنین

<sup>3</sup> Metallo- $\beta$ -Lactamase

<sup>4</sup> Insertion Sequence (IS) Elements

<sup>5</sup> Autonomous Transposable Elements

<sup>1</sup> World Health Organization

<sup>2</sup> Multidrug-resistant

تعیین شیوع عناصر IS در ژن *oprD* و نقش آن در غیر فعال کردن این پورین و به تبع آن ظهور مقاومت به کارباپنمها در میان سویه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا بود.

## روش کار

### ایزوله‌های بالینی و تست حساسیت ضد میکروبی

در این مطالعه از تعدادی سویه سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به کارباپنمها (به ترتیب ۵۸، ۴۲ و ۲۳ ایزوله مقاوم به ایمپنم، مروپنم و دورپنم) استفاده شد که از بین ۱۰۳ ایزوله جدا شده از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان‌های امام رضا، امام خمینی، بوعلی، علوی و سبلان شهر اردبیل بدست آمده بودند. سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به کارباپنمها از نمونه‌های بالینی ادرار، خون، خلط و زخم جداسازی و با روش‌های استاندارد میکروب شناسی و نیز مولکولی تعیین هویت شده بودند. تست حساسیت آنتی بیوتیکی این سویه‌ها نسبت به کارباپنمها قبلاً توسط روش دیسک دیفیوژن تعیین گردیده بود (پادتن طب، ایران) [۱].

### حضور ژن *oprD* در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به کارباپنمها

ژنوم تمامی سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به کارباپنمها با استفاده از روش جوشاندن<sup>۱</sup> استخراج شد. بعد از تایید وجود DNA استخراج شده، با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ، حضور ژن *oprD* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن (متایون، آلمان) (جدول ۱) و روش واکنش زنجیره‌ای

پلیمراز<sup>۲</sup> (PCR) تعیین شد. با توجه به طول بودن ژن *oprD* و به منظور بالابردن بازده PCR از دو جفت پرایمر برای تکثیر کامل ژن استفاده شد. سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا PAO1 به عنوان سویه کنترل مثبت ژن *oprD* مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۱). پس از الکتروفورز و مشاهده باند مربوط به ژن *oprD* در ژل آگارز ۱ درصد، محصول PCR برای توالی یابی ژنی<sup>۳</sup> (پیشگام، ایران) ارسال شد. توالی نوکلئوتیدی حاصل از توالی یابی ژنی با توالی نوکلئوتیدی ژن *oprD* سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا برای تایید حضور ژن مورد نظر مقایسه شد. پس از تایید حضور ژن، توالی نوکلئوتیدی ژن *oprD* در بانک ژن در مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی<sup>۴</sup> (NCBI) به شماره دسترسی ON009070 ثبت گردید.

### حضور عناصر توالی الحاقی (IS)

بعد از تایید حضور ژن *oprD* در روش PCR و مشاهده باند ژن در الکتروفورز، حدوداً ۱۳۳۲ جفت باز برای ژن *oprD* سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا PAO1، در صورتی که اندازه ژن *oprD* بیش از ۱۳۳۲ جفت باز بود، محصول PCR برای توالی یابی ژنی ارسال و نوع عناصر IS با استفاده از نرم افزار آنلاین ISfinder (<https://www-is.biotoul.fr/>) شناسایی شد.

<sup>2</sup> Polymerase Chain Reaction

<sup>3</sup> DNA Sequencing

<sup>4</sup> National Center for Biotechnology Information

<sup>1</sup> Boiling

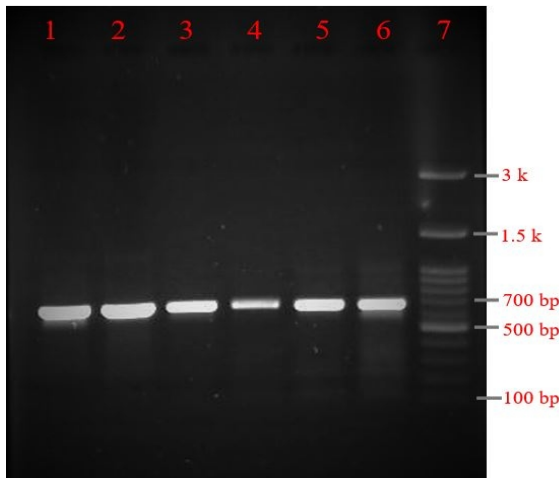
جدول ۱. توالی پرایمرهای استفاده شده و شرایط واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR)

منبع	اندازه محصول	شرایط PCR	توالی پرایمر	ژن
[۸]	۶۷۱ (مرحله ۱)	مرحله دناتوراسیون اولیه DNA: ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه	F: 5-ATGAAAGTGTGATGAAGTGGAGC-3 R: 5-AGGGAGGCGCTGAGGTT-3	<i>oprD</i> (a)
		مرحله دناتوراسیون ثانویه DNA: ۹۴ درجه به مدت ۱ دقیقه		
	۳۴ (مرحله)	مرحله اتصال پرایمر به DNA: ۵۷ درجه به مدت ۱ دقیقه	F: 5-AACCTCAGCGCCTCCCT-3 R: 5-ATACTGACCTCTCCTGTTCG-3	<i>oprD</i> (b)
		مرحله سنتز DNA: ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه		
[۸]	۶۷۴ (مرحله ۱)	مرحله دناتوراسیون اولیه DNA: ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه	F: 5-AACCTCAGCGCCTCCCT-3 R: 5-ATACTGACCTCTCCTGTTCG-3	<i>oprD</i> (b)
		مرحله دناتوراسیون ثانویه DNA: ۹۴ درجه به مدت ۱ دقیقه		
	۳۴ (مرحله)	مرحله اتصال پرایمر به DNA: ۵۷ درجه به مدت ۱ دقیقه	F: 5-AACCTCAGCGCCTCCCT-3 R: 5-ATACTGACCTCTCCTGTTCG-3	<i>oprD</i> (b)
		مرحله سنتز DNA: ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه		

## یافته‌ها

در مطالعه توصیفی حاضر، فراوانی ژن *oprD* بر اساس روش PCR ارزیابی (شکل ۱) و بدین ترتیب گزارش شد: در میان ۵۸ سویه سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به ایمپینم، فراوانی این ژن ۹۶/۵ درصد (۵۶ سویه) بود. سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به ایمپینم و دارای ژن *oprD* از ۳۰ نمونه ادرار، ۱۵ نمونه خلط، ۷ نمونه زخم و ۴ نمونه خون جداسازی شده بودند. فراوانی ژن *oprD* در میان ۴۲ ایزوله مقاوم به مروپنم، ۹۶/۵ درصد (۴۰ سویه) بود. ۴۰ سویه سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به مروپنم و حاوی ژن *oprD* از ۱۸ نمونه ادرار، ۱۳ نمونه خلط، ۵ نمونه زخم و ۴ نمونه خون جداسازی شده بودند. و در نهایت، فراوانی ژن *oprD* در میان ۲۳ ایزوله مقاوم به دورپینم، ۹۶/۵ درصد (۲۱ سویه) بود. ۲۱ سویه سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به دورپینم حاوی ژن *oprD* از ۹ نمونه ادرار، ۷ نمونه خلط، ۳ نمونه زخم و ۲ نمونه خون جداسازی شده بودند. ارتباط معنی‌داری بین حضور ژن *oprD* و نوع نمونه مشاهده نشد.

با توجه به عدم تغییر در اندازه ژن *oprD*، مطالعه حاضر نشان داد که شیوع عناصر IS در ژن *oprD* سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به کاربپنم‌ها جدا شده از بیمارستان‌های شهر اردبیل صفر درصد می‌باشد.



شکل ۱. الکتروفورز محصولات PCR ژن *oprD* سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به کاربپنم‌ها. چاهک‌های ۱ تا ۵: ژن *oprD* سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از نمونه‌های بالینی (۶۷۱ bp و ۶۷۴ bp). چاهک ۶: ژن *oprD* سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا PAO1 و چاهک ۷: مارکر ۱۰۰ bp.

## بحث

شیوع گسترده سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به کاربپنم‌ها در مراکز بهداشتی و درمانی، زنگ خطر جهانی را به صدا در آورده است، که کنترل آن مستلزم نظارت مداوم بر روند مقاومت و تحقیقات بیشتر روی مکانیسم‌های ایجاد مقاومت در باکتری‌ها می‌باشد. با توجه به بالابودن فراوانی مقاومت به کاربپنم‌ها در سویه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا در شهر اردبیل، در این مطالعه، یکی از مهمترین مکانیسم‌های دخیل در مقاومت باکتری به کاربپنم‌ها، در ارتباط با پورین OprD، مورد ارزیابی قرار گرفت [۲].

کردند. نتایج توالی یابی DNA و مقایسه آنها با ژن *oprD* در سودوموناس آئروژینوزا PAO1 نشان از حضور عناصر *ISPa1328* و *ISPpu21* داشت [۱۳]. شریعتی و همکاران، و میرصالحیان و همکاران هم حضور عناصر *ISPpu21* در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به کاربایتمها را گزارش کرده‌اند [۱۵، ۱۶]. تعیین توالی ژن *oprD* و تجزیه و تحلیل آن در مطالعه کلانتر-نیستانکی و همکاران نشان داد که توالی *ISPpu22*، بطول ۱۲۳۲ جفت باز، در موقعیت ۸ در ناحیه کدکننده ژن *oprD* اضافه شده است که با ایجاد مقاومت سودوموناس آئروژینوزا به کاربایتمها مرتبط می‌باشد [۱۷]. در مطالعه رویز-مارتینز<sup>۳</sup> و همکاران، *ISPa133*، البایسری<sup>۴</sup> و همکاران، *ISPa1328*، دینه<sup>۵</sup> و همکاران، *ISPa46*، روجو-بزارس<sup>۶</sup> و همکاران، *ISPa45*، اوانز<sup>۷</sup> و همکاران، *ISPa26*، فاولر<sup>۸</sup> و همکاران، *ISPa8*، عناصر IS بودند که شناسایی شدند [۱۰]. در مطالعه حاضر، بررسی محصولات PCR ژن *oprD* در سویه‌های مقاوم به کاربایتم سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیمارستان‌های شهر اردبیل، هیچگونه افزایشی در اندازه ژن *oprD*، بطول ۱۳۳۲ جفت باز، مشاهده نشد. این نتایج نشان می‌دهد عناصر IS نقشی در پیدایش سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به کاربایتمها ندارند. وجود موتاسیون‌های غیرفعال‌کننده از نوع حذف یا اضافه شدن نوکلئوتیدی در ژن *oprD* و یا موتاسیون‌های نقطه ای ممکن است در ظهور سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به کاربایتمها نقش داشته باشند. فاضلی و همکاران در مطالعه انجام شده در شهر اصفهان، وجود موتاسیون‌های نقطه ای که منجر به تغییر آمینواسیدی

در مطالعه حاضر، فراوانی ژن *oprD* در میان سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به کاربایتمها ۹۶/۵ درصد بود. مطالعه منتشر شده در سال ۲۰۱۹ توسط نمیمما<sup>۱</sup> و همکاران، در کشور نیجریه، نشان داد که ۹۰ درصد از سویه‌های مقاوم به کاربایتمها دارای ژن *oprD* بودند [۱۲]. در مطالعه منتشر شده توسط صدرالدین امین و همکاران، در شهر تهران، ۸۹ درصد از سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا دارای ژن *oprD* بودند [۱۳]. در مطالعه منتشر شده توسط متقی و همکاران در شهر شیراز، از ۶۶ سویه بالینی سودوموناس آئروژینوزا جداسازی شده، ۶۱ درصد حاوی ژن *oprD* بودند [۱۴]. متفاوت بودن نتایج را می‌توان به وجود موتاسیون‌ها، تغییرات الی و مواد و روش کار نسبت داد.

از دست دادن پورین OprD از غشای خارجی سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا هم در سطح رونویسی و هم در سطح ترجمه رخ می‌دهد. جهش‌ها در ژن ساختاری *oprD*، که یک کدون توقف زودرس ایجاد کرده و موجب خاتمه زود هنگام ترجمه می‌شوند، در سویه‌های بالینی شناسایی شده است [۱۱]. تغییر در ژن کدکننده پورین OprD توسط عناصر IS یکی از مکانیسم‌هایی است که مقاومت به کاربایتمها را در سودوموناس آئروژینوزا ایجاد می‌کند. اولین بار والتر<sup>۲</sup> و همکاران در سال ۲۰۰۴ از نقش عناصر IS، مانند *ISPa1328* و *ISPa1635*، در غیرفعال کردن بیان ژن *oprD* و افزایش مقاومت به کاربایتمها گزارشی ارائه کردند [۱۱]. از آن زمان تاکنون، حضور عناصر IS مختل‌کننده ژن *oprD* در مطالعات مختلفی در ایران و جهان گزارش شده است. برای مثال، صدرالدین امین و همکاران در بررسی ژن *oprD* در ایزوله‌های مقاوم به کاربایتمها، اندازه محصولات PCR را بزرگتر از حد انتظار مشاهده

<sup>3</sup> Ruiz-Martinez<sup>4</sup> Al-Bayssari<sup>5</sup> Diene<sup>6</sup> Rojo-Bezarez<sup>7</sup> Evans<sup>8</sup> Fowler<sup>1</sup> Nmema<sup>2</sup> Wolter

### نتیجه گیری

در این مطالعه، حضور عناصر IS غیرفعال کننده ژن *oprD* به عنوان یکی از مکانیسم‌های مقاومت سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* به کارباینها تأیید نشد. با توجه به مطالعات پیشین در خصوص نقش دیگر مکانیسم‌های مقاومت به کارباینها در سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از بیمارستان‌های شهر اردبیل، بررسی تاثیر موتاسیون‌ها (حذف یا اضافه شدن نوکلئوتیدی و یا موتاسیون‌های نقطه‌ای) در غیرفعال کردن و کاهش بیان ژن *oprD* و افزایش مقاومت باکتری به کارباینها توصیه می‌شود.

### تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از پایان نامه مقطع دکتری حرفه ای و مصوب معاونت پژوهشی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، با کد سند ۴۰۰۰۰۰۹۰۷ و کد اخلاق IR.ARUMS.MEDICINE.REC.1401.010 می‌باشد. نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از همکاری کارکنان محترم آزمایشگاه در کلیه بیمارستان‌های تحت پوشش دانشگاه علوم پزشکی اردبیل اعلام می‌دارند.

در ژن *oprD* در سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* مقاوم به کارباینها شده بود را گزارش کرده‌اند [۱۸]. لکن، حضور موتاسیون‌های نقطه‌ای در ژن *oprD* در این مطالعه بررسی نشد. از طرف دیگر، بررسی سایر مکانیسم‌های مقاومت به کارباینها در مطالعات قبلی ما نشان می‌دهد که سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* در شهر اردبیل یا از طریق تولید آنتی‌بیوتیک‌های MBL (عمدتاً *blaIMP* و *blaVIM*) [۱۹]، یا از طریق افزایش تولید AmpC سفالوسپوریناز کروموزومی [منتشر نشده] و یا حضور یکی از چهار ایفلاکس پمپ مهم *سودوموناس* یعنی MexEF-OprN، MexCD-OprJ، MexAB-OprM و MexXY-OprM به کارباینها مقاوم می‌باشند [منتشر نشده]. از طرف دیگر، مطالعه قبلی ما نشان می‌دهد اینتگرون‌های کلاس I نقش مهمی در پیدایش سویه‌های MDR *سودوموناس آئروژینوزا* و نیز سویه‌های مقاوم به کارباینها از طریق انتقال کاست‌های ژنی مقاومت دارند، زیرا شیوع ژن اینتگرون کلاس I در بین سویه‌های مقاوم به کارباینها (دوربینم ۴۴/۷٪، ایمینم ۸۵/۵٪ و مروپنم ۶۲/۷٪) جدا شده در شهر اردبیل بالا بود [۴].

### References

- 1- Bazghandi SA, Safarirad S, Arzanlou M, Peeri-Dogaheh H, Ali-Mohammadi H, Khademi F. Prevalence of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains in Ardabil. J Ardabil Univ Med Sci. Summer 2020; 20(2): 280-6. [Full text in Persian]
- 2- Bazghandi SA, Arzanlou M, Peeridogaheh H, Vaez H, Sahebkar A, Khademi F. Prevalence of Virulence Genes and Drug Resistance Profiles of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated From Clinical Specimens. Jundishapur J Microbiol. 2021 Aug; 14(8): 1-7.
- 3- Khademi F, Maarofi K, Arzanlou M, Peeri-Dogaheh H, Sahebkar A. Which missense mutations associated with DNA gyrase and topoisomerase IV are involved in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates resistance to ciprofloxacin in Ardabil?. Gene Rep. 2021 Sep; 24: 101211.
- 4- Khademi F, Ashrafi SS, Neyestani Z, Vaez H, Sahebkar A. Prevalence of class I, II and III integrons in multidrug-resistant and carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Gene Rep. 2021 Dec; 25: 101407.
- 5- Rodríguez-Martínez JM, Poirel L, Nordmann P. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2009 Nov; 53(11): 4783-8.
- 6- Vaez H, Salehi-Abargouei A, Ghalehnoo ZR, Khademi F. Multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Iran: A systematic review and metaanalysis. J Glob Infect Dis. 2018 Oct; 10(4): 212.

- 7- Fowler RC, Hanson ND. Emergence of carbapenem resistance due to the novel insertion sequence IS Pa 8 in *Pseudomonas aeruginosa*. PLoS One. 2014 Mar; 9(3): e91299.
- 8- Farra A, Islam S, Stralfors A, Sörberg M, Wretling B. Role of outer membrane protein OprD and penicillin-binding proteins in resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to imipenem and meropenem. Int J Antimicrob Agents. 2008 May; 31(5): 427-33.
- 9- Ocampo-Sosa AA, Cabot G, Rodríguez C, Roman E, Tubau F, Macia MD, et al. 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 Apr; 56(4): 1703-13.
- 10- Vandecraen J, Chandler M, Aertsen A, Van Houdt R. The impact of insertion sequences on bacterial genome plasticity and adaptability. Crit Rev Microbiol. 2017 Nov; 43(6): 709-30.
- 11- Wolter DJ, Hanson ND, Lister PD. Insertional inactivation of *oprD* in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* leading to carbapenem resistance. FEMS Microbiol Lett. 2004 Jul; 236(1): 137-43.
- 12- Nmema EE, Osuagwu CS, Anaele EN. *oprD* Genes Detected in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from a Teaching Hospital but Lost in a Carbapenem-Resistant Strain. J Adv Med Med Res. 2019 May:1-8.
- 13- Sadredinamin M, Hashemi A, Goudarzi H, Tarashi S, Yousefi Nojookambari N, Erfanimanesh S. Detection of ISPa1328 and ISPu21, two novel insertion sequences in the OprD porin and *bla IMP-1* gene among metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. Arch Trauma Res. 2017 Mar; 6(1): e36239.
- 14- Motaghi B, Najafipour S. Outer membrane protein D gene in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and its role in antibiotic resistance. J Fasa Univ Med Sci. Winter 2016; 5(4): 501-7. [Full text in Persian]
- 15- Shariati A, Azimi T, Ardebili A, Chirani AS, Bahramian A, Pormohammad A, et al. Insertional inactivation of *oprD* in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients in Tehran, Iran. New Microbe and New Infect. 2018 Jan; 21: 75-80.
- 16- Mirsalehian A, Kalantar-Neyestanaki D, Taherikalani M, Jabalameli F, Emaneini M. Determination of carbapenem resistance mechanism in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients, in Tehran, Iran. J Epidemiol Glob Health. 2017 Sep; 7(3): 155-9.
- 17- Kalantar-Neyestanaki D, Emaneini M, Jabalameli F, Taherikalani M, Mirsalehian A. ISPu22, a novel insertion sequence in the *oprD* porin gene of a carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from a burn patient in Tehran, Iran. Iran J Microbiol. 2015 Oct; 7(5): 247-250.
- 18- 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 Oct; 2(4): 147-52.
- 19- Safarirad S, Arzanlou M, Mohammadshahi J, Vaez H, Sahebkar A, Khademi F. Prevalence and characteristics of metallo-beta-lactamase-positive and high-risk clone ST235 *Pseudomonas aeruginosa* at Ardabil hospitals. Jundishapur J Microbiol. 2021 Mar; 14(3): e115819.