

## Investigating the Frequency of *AlgD* Gene in Clinical Isolates of *Pseudomonas Aeruginosa* Collected from Teaching-Therapeutic Hospitals of Mazandaran-2022

Mohammad Kaboli Chalmardi<sup>1</sup>,  
 Mehrdad Gholami<sup>2</sup>,  
 Negar Hajilou<sup>3</sup>,  
 Maedeh Kakavan<sup>3</sup>,  
 Mehdi Haghshenas<sup>4</sup>,  
 Hamid Reza Goli<sup>5,6</sup>

<sup>1</sup> Medical Student, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>2</sup> Assistant Professor, Department of Medical Microbiology and Virology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>3</sup> MSc Student in Microbiology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>4</sup> Medical Student, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>5</sup> Molecular and Cell Biology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>6</sup> Associate Professor, Department of Medical Microbiology and Virology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received December 16, 2023; Accepted April 3, 2024)

### Abstract

**Background and purpose:** *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic nosocomial pathogen, which is resistant to different groups of antibiotics. Infections caused by this organism due to antibiotic resistance may ultimately cause high mortality. The ability of this microorganism to produce pathogenic factors such as alginate, proteases, pyocyanin, rhamnolipid, phospholipase C, the presence of pili, and the ability to form biofilm and colonization have made this bacterium one of the most important pathogens. Considering that alginate is one of the important pathogenic factors of this microorganism which mainly *algA*, *algC*, and *algD* genes encode enzymes necessary for the leading biosynthesis pathway of alginate-GDP-mannuronic acid. Therefore, in the current study, we investigated the frequency of the *algD* gene in *P. aeruginosa* isolated from patients hospitalized in Mazandaran hospitals using specific primers by PCR method.

**Materials and methods:** According to the results of past studies and using the sample size formula to calculate the prevalence and considering the maximum error of 0.05, the confidence level of 0.95, the ratio of 0.97, and the sample size of the unlimited population was estimated to be 100 isolates. Clinical isolates of *P. aeruginosa* were collected from different laboratories of Mazandaran educational hospitals. After collecting the clinical isolates of *P. aeruginosa* and definitively identifying the bacteria by performing routine biochemical tests, the antibiotic resistance pattern of the isolates was checked with Agar Diffusion Disk. In the next step, we extracted the DNA of *P. aeruginosa* strains by alkaline lysis method by adding sodium dodecyl sulfate and NaOH. Finally, a PCR test was performed using the specific primer of the *algD* gene. Then, the PCR product was evaluated using a UV Transilluminator device. Data were analyzed using SPSS software.

**Results:** 100 isolates of *P. aeruginosa* were isolated from 100 hospitalized patients. These isolates were collected from five medical educational hospitals of Mazandaran province, which were as follows: Imam Khomeini Hospital in Sari (40 isolates), Razi Hospital in Qaemshahr (22 isolates), Bo Ali Sina Hospital in Sari (17 isolates), Zare Psychiatric and Burn hospital in Sari (11 isolates), and Fatemeh Zahra heart hospital in Sari (10 isolates). Most of the clinical isolates of *P. aeruginosa* in the present study were obtained from sputum samples (37/100) and in second place from urine samples (26/100) of patients. 98 isolates had the *algD* gene. 26% of isolates were resistant to Piperacillin, 39% of isolates to Aztreonam, 27% of isolates to Ceftazidime, 31% of isolates to Imipenem, 39% to Tobramycin and 41% to Ciprofloxacin. All clinical isolates resistant to studied antibiotics carried the *algD* gene. Only two isolates of the sensitive strains of this organism in each group of antibiotics lacked the desired gene.

**Conclusion:** The results of the present study show that the *algD* gene is present in most of the clinical isolates of the *P. aeruginosa* strain obtained from medical education centers in Mazandaran. On the other hand, the high prevalence of this organism and the high resistance to antibiotics and multiple drugs observed in the current study and previous studies have turned the treatment of infections caused by *P. aeruginosa* into a serious and complex problem. Finally, considering that the *algD* gene plays a significant role in the formation of biofilm and antibiotic resistance, the results of the current study also confirm this finding.

**Keywords:** *pseudomonas aeruginosa*; antibiotic resistance; alginate; *algD*, mazandaran

J Mazandaran Univ Med Sci 2024; 34 (232): 218-226 (Persian).

**Corresponding Author:** Hamid Reza Goli - Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.  
 (E-mail: goli59@gmail.com)

## بررسی فراوانی ژن *algD* در ایزوله های بالینی سودوموناس آئروژینوزا جمع آوری شده از بیمارستان های آموزشی-درمانی مازندران ۱۴۰۱

محمد کابلی چلمردی<sup>۱</sup>  
مهرداد غلامی<sup>۲</sup>  
نگار حاجیلو<sup>۳</sup>  
مائده کاکاون<sup>۳</sup>  
مهدی حق شناس<sup>۴</sup>  
حمیدرضا گلی<sup>۵،۶</sup>

### چکیده

**سابقه و هدف:** سودوموناس آئروژینوزا یکی از عوامل فرصت طلب عفونت بیمارستانی است که به گروه های مختلف آنتی بیوتیک ها مقاوم است. عفونت های ناشی از این ارگانیسم به علت مقاومت آنتی بیوتیکی ممکن است در نهایت موجب مرگ و میر بالایی شود. توانایی این میکروارگانیسم در تولید فاکتورهای بیماری زایی همچون آلزینات، پروتئازها، پیوسیانین، رامنولیبید، فسفولیپاز C، وجود پیل و توانایی تشکیل بیوفیلم و کلونیزاسیون سبب شده است که این باکتری به عنوان یکی از مهم ترین پاتوژن های بیماری زا به شمار رود. با توجه به این که آلزینات یکی از عوامل بیماری زای مهم این میکروارگانیسم است و با توجه به این که عمدتاً ژن های *algC* و *algD* آنزیم های ضروری برای مسیر بیوستز پیشرو آلزینات-GDP-مانورونیک اسید را کد می کنند، مطالعه حاضر با هدف بررسی فراوانی ژن *algD* در سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان های مازندران، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی به روش PCR، انجام پذیرفت.

**مواد و روش ها:** با توجه به نتایج مطالعات گذشته و استفاده از فرمول حجم نمونه برای محاسبه شیوع و در نظر گرفتن حداکثر خطای ۰/۰۵، سطح اطمینان ۰/۹۵، و نسبت ۰/۹۷، حجم نمونه برای جامعه نامحدود برابر ۱۰۰ ایزوله برآورد شد. ایزوله های بالینی سودوموناس آئروژینوزا از آزمایشگاه های مختلف بیمارستان های آموزشی درمانی مازندران جمع آوری شدند. پس از جمع آوری ایزوله های بالینی سودوموناس آئروژینوزا و شناسایی قطعی باکتری با انجام آزمایش های معمول بیوشیمیایی، الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله ها با روش دیسک آگار دیفیوژن بررسی شد. در مرحله بعد با افزودن سدیم دودسیل سولفات و NaOH، DNA سویه های سودوموناس آئروژینوزا به روش لیز قلبایی استخراج شد. در نهایت تست PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی ژن *algD* انجام شد. سپس محصول PCR با استفاده از دستگاه UV ترانس لومینیتور مورد ارزیابی قرار گرفت. داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

**یافته ها:** تعداد ۱۰۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا از ۱۰۰ بیمار بستری در بیمارستان ها جدا شد. این ایزوله ها از پنج بیمارستان آموزشی درمانی استان مازندران، بیمارستان امام خمینی ساری (۴۰ ایزوله)، بیمارستان رازی قائمشهر (۲۲ ایزوله)، بیمارستان بوعلی سینا ساری (۱۷ ایزوله)، بیمارستان روانپزشکی و سوختگی زارع ساری (۱۱ ایزوله) و بیمارستان قلب فاطمه زهرا ساری (۱۰ ایزوله) جمع آوری شدند. بیش تر ایزوله های بالینی سودوموناس آئروژینوزا در مطالعه حاضر از نمونه های خلط (۳۷/۱۰۰) و در رتبه دوم از نمونه های ادرار (۲۶/۱۰۰) بیماران به دست آمد. در این مطالعه، ۹۸ ایزوله حامل ژن *algD* بودند. هم چنین، ۲۶ درصد ایزوله ها به پیراسیلین، ۳۹ درصد ایزوله ها به آزترنونام، ۲۷ درصد ایزوله ها به سفنازیدیم، ۳۱ درصد ایزوله ها به ایمی پنم، ۳۹ درصد به توبراماسین و ۴۱ درصد به سپروفلوکساسین مقاوم بودند. تمام ایزوله های بالینی مقاوم به آنتی بیوتیک های مورد مطالعه حامل ژن *algD* بودند. تنها دو ایزوله از سویه های حساس این ارگانیسم در هر گروه آنتی بیوتیک فاقد ژن مورد نظر بودند.

**استنتاج:** نتایج مطالعه ای حال حاضر نشان می دهد که ژن *algD* در غالب ایزوله های بالینی سویه سودوموناس آئروژینوزا تهیه شده از مراکز آموزشی درمانی مازندران وجود دارد. از سوی دیگر شیوع بالای این ارگانیسم و مقاومت بالای آنتی بیوتیکی و چند دارویی که در مطالعه حال حاضر و مطالعات پیشین مشاهده شده است، درمان عفونت های ناشی از سودوموناس آئروژینوزا را به مشکلی جدی و پیچیده در مراکز درمانی تبدیل نموده است. در نهایت با توجه به این که ژن *algD* در تشکیل بیوفیلم و مقاومت آنتی بیوتیکی نقش به سزایی دارد. نتایج مطالعه حال حاضر نیز این یافته را تایید می کند.

**واژه های کلیدی:** سودوموناس آئروژینوزا، مقاومت آنتی بیوتیکی، آلزینات، *algD* مازندران

E-mail: goli59@gmail.com

**مؤلف مسئول:** حمیدرضا گلی - ساری: کیلومتر ۱۷ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم (ص)، دانشکده پزشکی

۱. دانشجوی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
  ۲. استادیار، گروه میکروب شناسی و ویروس شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
  ۳. دانشجوی دانشجو کارشناسی ارشد میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
  ۴. دانشجوی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
  ۵. مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
  ۶. دانشیار، گروه میکروب شناسی و ویروس شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
- تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۹/۲۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۲/۱۰/۱۷ تاریخ تصویب: ۱۴۰۳/۱/۱۵

## مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا یکی از علل عفونت های فرصت طلب بیمارستانی و مقاوم به گروه های مختلفی از آنتی بیوتیک ها است (۱). این باکتری از مکانیسم هایی همچون تولید آنزیم های تخریب کننده، افزایش بیان پمپ های افلاکس، کاهش خروج دارو، ایجاد موتاسیون های کروموزومی، تولید کپسول و بیوفیلیم برای ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی استفاده می کند (۲،۱). این میکروارگانیسم عامل عفونت های جدی همچون سپتی سمی، اندوکاردیت و اوتیت خارجی بوده و به علت تولید فاکتورهای بیماری زاایی همچون آلترینات، پروتازها، پیوسیانین، رامولپید، فسفولیپاز C، پیلی و بیوفیلیم و کلونیزاسیون، به عنوان یکی از مهم ترین پاتوژن های بیماری زا به شمار می رود (۳،۱).

تعدد عوامل ویرولانس سبب ایجاد عفونت های شدید و کشنده در مبتلایان به بیماری های زمینه ای همچون سیستمیک فیروزیس، عفونت های مزمن ریوی، برونشکنازی، سوختگی، نئوپلازی، نوتروپنی، ایدز و ... شود (۳). تولید کپسولی از جنس آلترینات به عنوان یکی از مهم ترین فاکتورهای بیماری زاایی این ارگانیسم باعث اتصال به سلول میزبان و سهولت در تشکیل میکروکلونی در بافت هدف می گردد (۴). آلترینات یک آگرو-پلی ساکارید متشکل از D-mannuronic اسید و L-guluronic اسید است و تولید آن برای تشکیل فنوتیپ مخاطی سودوموناس آئروژینوزا که در CF دیده می شود، ضروری است (۵).

*AlgA*، *AlgC* و *AlgD* آنزیم های مهمی در تولید GDP-mannuronic acid هستند (۶). *AlgA* تولید مانوز-۶ فسفات از فروکتوز-۶ فسفات و GDP-mannose از مانوز-۱ فسفات را کاتالیز می کند، در حالی که *AlgC* نیز تبدیل مانوز-۶ فسفات به مانوز-۱ فسفات را کاتالیز می کند (۶). *AlgD* یک GDP-mannose دهیدروژناز است که تولید GDP-mannuronic acid از GDP-mannose را کاتالیز می کند (۷). بنابراین کنترل

بیوسنتز آلترینات توسط اپرون *algD* انجام می شود (۶). با توجه به این که آلترینات یکی از فاکتورهای مهم بیماری زاایی این میکروارگانیسم به شمار می رود و به علت نقش مهم ژن *algD* در بیوسنتز آلترینات، لذا در مطالعه ی حال حاضر به بررسی فراوانی ژن *algD* در ایزوله های سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان های آموزشی درمانی استان مازندران، پرداخته شد.

## مواد و روش ها

طراحی تحقیق، جمع آوری نمونه و تعیین هویت باکتری ها مطالعه مذکور توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مازندران با کد اخلاق IR.MAZUMS.REC.1401.359 تصویب گردید. در ضمن، تمامی موارد رعایت اخلاق در پژوهش رعایت شده و اطلاعات بیماران به طور محرمانه نگه داشته شده اند. در این مطالعه توصیفی-تحلیلی، تعداد ۱۰۰ ایزوله بالینی سودوموناس آئروژینوزا از آزمایشگاه های مختلف بیمارستان های آموزشی درمانی مازندران جمع آوری شده و پس از انجام تست های بیوشیمیایی روتین (شامل رنگ آمیزی گرم، مرفولوژی کلنی ها، تولید پیگمان بر روی محیط مولر هیتون آگار، تست های اکسیداز، کاتالاز، واکنش غیر تخمیری در محیط TSI (Triple Sugare Iron Agar)، سیمون سترات، SIM، رشد در سیتیرماید آگار، رشد در دمای ۴۲ درجه و بوی کلنی به صورت قطعی تعیین هویت شدند (۸). سپس باکتری ها در محیط کشت Tryptic Soy Broth حاوی ۱۰ درصد گلیسرول کشت شده و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله ها

برای انجام تست دیسک آگار دیفیوژن، ابتدا یک کشت ۲۴ ساعته از باکتری ها تهیه گردید. سپس، کدورتی معادل نیم مک فارلند (حاوی  $10^8 \times 1/5$ ) از

PCR انجام شد (۱۱). جهت انجام تست PCR، ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها همراه با ۱/۵ میکرولیتر DNA (۹۰۰ نانوگرم) در ترکیب با ۷/۵ میکرولیتر از Master mix و ۵ میکرولیتر آب مقطر با حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر، مورد استفاده قرار گرفت. مرحله ی اولیه واپاشی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. سپس، ۳۴ سیکل به شرح زیر انجام گردید. واپاشی (Denaturation) در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها (Annealing) در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، تکثیر (Extension) در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ ثانیه در نهایت، یک دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه جهت تکثیر نهایی محصول PCR انجام شد. سپس، محصول PCR با طول قطعه ۱۳۱۰ bp بر روی ژل آگارز ۱ درصد (Wiz biosolution) با ۱/۵ میکرولیتر Safe Stain (SinaClon، ایران) الکتروفورز شده و با استفاده از دستگاه UV ترانس لومینیتور مورد ارزیابی قرار گرفت.

#### تجزیه و تحلیل آماری

اطلاعات حاصل از این مطالعه با استفاده از نرم افزار آماری SPSS 22 و تست آماری Chi-square مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و P value کم تر از ۰/۰۵ از لحاظ آماری معنادار در نظر گرفته شد.

#### یافته ها و بحث

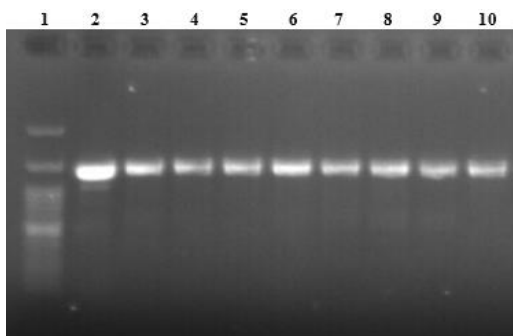
سودوموناس آئروژینوزا یکی از مهم ترین پاتوژن های مقاوم به آنتی بیوتیک و ایجاد کننده عفونت های جدی در بیماران به خصوص بیماران دچار سوختگی است و تشکیل بیوفیلم از جمله مکانیسم هایی است که مقاومت آنتی بیوتیکی را تقویت می کند (۱۲). در سودوموناس آئروژینوزا، ماتریکس بیوفیلم های ایجاد شده از ژن های *psl* و *pel algD* تشکیل شده است (۱۲). آلترینات یک پلیمر خطی متشکل از  $\beta$ -d-mannuronic acid و  $\alpha$ -l-guluronic acid است و نقش مهمی در پایداری

باکتری ها تهیه شده و با استفاده از سوآب سر پنبه ای سوسپانسیون باکتری بر روی محیط کشت مولر هیتون آگار به صورت چمنی کشت داده شد. سپس، دیسک های آنتی بیوتیکی با فاصله ۱۵ میلی متر از لبه پلیت و ۲۵ میلی متر از یکدیگر بر روی سطح محیط کشت قرار گرفتند. پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شده، پس از ۲۴ ساعت، قطر هاله های عدم رشد باکتری در اطراف دیسک ها با خط کش اندازه گیری شدند و بر اساس دستورالعمل های انستیتو استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI 2023) نتایج تفسیر شدند. ایزوله ها به صورت مقاوم، مقاوم حد واسط یا حساس گزارش گردیدند (۹). برای کنترل کیفی این تست از سویه سودوموناس آئروژینوزای ATCC 27853 استفاده شد.

#### استخراج DNA و انجام تست PCR

DNA سویه های سودوموناس آئروژینوزا به روش لیز قلیایی با افزودن سدیم دودسیل سولفات (SDS) و NaOH استخراج شد (۱۰). به طور خلاصه، با حل کردن ۰/۵ گرم SDS (Sigma، آلمان) و ۰/۴ گرم (Sigma) NaOH در ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل، محلول استخراج آماده شد. سپس، ۴ تا ۶ کلونی از باکتری های خالص در ۲۰ میکرولیتر از این محلول حل شدند و میکروتیوب به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد انکوبه شد و بعد به مدت ۳ دقیقه در ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. در نهایت، ۱۸۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به میکروتیوب اضافه و از مایع رویی به عنوان DNA استفاده شد (۱۰). OD (چگالی نوری) DNA ها با استفاده از نانو دراپ (ND1000، ایالات متحده آمریکا) اندازه گیری شد. هم چنین، DNA های استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد (Wizbiosolutions، کره جنوبی) الکتروفورز شدند. در مرحله ی بعد، با استفاده از پرایمر اختصاصی ژن *algD* Forward: ATGCGAATCAGCATCTTTGGT و Reverse: TACCAGCAGATGCCCTCGGC تست

مردان (۳ ایزوله)، اورژانس (۱۳ ایزوله)، بخش زنان (۲ ایزوله)، بخش انکولوژی (۱ ایزوله)، بخش مراقبت‌های قلبی (۵ ایزوله)، بخش نورولوژی (۲ ایزوله) و بخش کودکان (۵ ایزوله) جمع آوری شدند. در مطالعه جامعی که در ۷۲ کشور جهان به منظور بررسی شیوع سودوموناس آئروژینوزا انجام شده بود، سودوموناس آئروژینوزا یکی از شایع ترین ارگانیسیم‌ها در بیماران بستری در بخش‌های مراقبت ویژه بوده است (۲۰). در مطالعه حاضر، از مجموع ۱۰۰ ایزوله نمونه‌های بالینی، ۹۸ ایزوله واجد ژن *algD* بودند. تصویر شماره ۱ نتایج تست PCR برای شناسایی ژن *algD* مورد مطالعه را نشان می‌دهد.



تصویر شماره ۱: نتیجه الکتروفورز محصول PCR برای ژن *algD* از میان تنها ۱۰۰ ایزوله بالینی به دست آمده تنها ۹۸ ایزوله واجد ژن *algD* بودند (ردیف ۱: DNA Marker، ردیف ۲: کنترل مثبت، ردیف ۳ به بعد: نمونه های اصلی).

از میان ۲ ایزوله فاقد ژن *algD* یک ایزوله بالینی از بخش CCU و یک مورد از بخش ICU جمع آوری شده بودند. تمامی سویه‌های جدا شده از نمونه‌های خون، کاتتر، ترشحات چشمی، ترشحات زخم پای دیابتی، مدفوع و زخم حامل ژن *algD* بودند، در حالی که از ۳۷ ایزوله خلط و ۲۶ ایزوله ادرار، هر کدام یک ایزوله فاقد ژن مورد نظر بودند. به لحاظ آماری ارتباط معنی داری میان حضور ژن *algD* با سن، جنسیت، بخش بیمارستانی و نوع نمونه بالینی مشاهده نگردید ( $P > 0.05$ ). در مطالعه رجیبی و همکاران، از مجموع ۱۱۲ ایزوله بالینی مورد مطالعه، ۸۸ (۷۸/۶ درصد) مورد حامل ژن

ساختاری و حفاظت از بیوفیلم دارد (۱۳). سنتز آلزینات در سودوموناس آئروژینوزا توسط اپرون *algACD* کنترل می‌شود. *AlgD* کدگذاری شده توسط ژن *algD* یک GDP-mannose dehydrogenase است که تولید GDP-mannuronic acid از GDP-mannose را کاتالیز می‌کند (۶). ژن *algD* واسطه کنترل بیوسنتز آلزینات و رونویسی پروتئین‌های Alg و مسئول تولید نهایی پیش‌ساز GDP-mannuronic acid، مولکول پایه پلیمریزاسیون و سنتز آلزینات است (۱۴). با توجه به اهمیت این ژن در پایداری بیوفیلم و ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی ناشی از سودوموناس آئروژینوزا، در مطالعه حال حاضر به بررسی فراوانی ژن *algD* در ایزوله‌های بالینی تهیه شده از مراکز آموزشی-درمانی مازندران پرداخته شد. تعداد ۱۰۰ ایزوله بیمارستانی غیرتکراری سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از ۱۰۰ بیمار بستری وارد مطالعه جدا شدند، در حالی که ۶۱ ایزوله (۶۱ درصد) از مردان و ۳۹ ایزوله (۳۹ درصد) از بیماران خانم به دست آمده بودند. نتایج مشابهی توسط Al-Hasan و همکاران و Khan و همکاران گزارش شده است (۱۵، ۱۶).

فاضلی و همکاران بر این باور هستند که شیوع بالای سودوموناس آئروژینوزا در بیماران مرد در شغل آن‌ها نهفته است که معمولاً شامل کارهای سخت خارج از خانه می‌شود، در حالی که زنان ایرانی معمولاً خانه‌دار هستند و از محیط‌های آلوده دورتر هستند (۱۷). ایزوله‌های باکتریایی مطالعه حاضر از نمونه‌های بالینی خلط (۳۷ ایزوله)، زخم (۱۹ ایزوله)، ادرار (۲۶ ایزوله)، خون (۵ ایزوله)، ترشحات زخم پای دیابتی (۱ ایزوله)، مدفوع (۲ ایزوله)، ترشحات چشمی (۲ ایزوله) و کاتتر وریدی (۸ ایزوله) جداسازی شده بودند. بروز بالای سودوموناس آئروژینوزا در عفونت‌های تنفسی در مطالعات پیشین نیز گزارش شده است (۱۹، ۱۸). هم‌چنین، سویه‌های مطالعه حاضر از بیماران بستری در بخش‌های مراقبت ویژه (۵۳ ایزوله)، بخش سوختگی (۶ ایزوله)، بخش داخلی (۴ ایزوله)، اتاق عمل و بخش جراحی (۶ ایزوله)، بخش

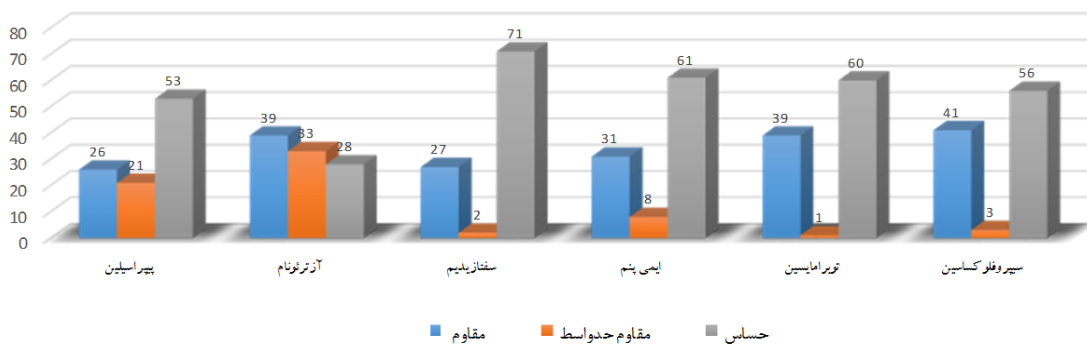
*toxA* و ترشح پیوسیانین در بین ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا بسیار بالا بوده است (۲۴).

همچنین، در مطالعه حاضر، ۲۶ درصد ایزوله‌ها نسبت به پیراسیلین، ۳۹ درصد به آزترونام، ۲۷ درصد به سفنازیدیم، ۳۱ درصد به ایمی پنم، ۳۹ درصد به توبرامایسین و ۴۱ درصد ایزوله‌ها به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند (نمودار شماره ۱).

به لحاظ آماری ارتباط معنی‌داری میان وجود ژن *algD* و بروز مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه مشاهده نشد ( $P > 0/05$ ) (جدول شماره ۱). نظارت جامع بر مقاومت آنتی‌بیوتیکی در کشورهای اروپایی در سال ۲۰۱۷، طیفی از مقاومت ترکیبی (مقاومت به سه یا چند گروه آنتی‌بیوتیکی) را از ۰ درصد در ایسلند تا ۵۹/۱ درصد در رومانی را نشان داد (۱۴). هم‌چنین، شیوع سودوموناس آئروژینوزا MDR در ایران بین ۱۶ تا ۱۰۰ درصد گزارش شده است (۲۵). در مطالعه حال حاضر، بیش‌ترین مقاومت ایزوله‌های بالینی به ترتیب مربوط به سیپروفلوکساسین، آزترونام و توبرامایسین بوده است.

*algD* بودند (۱۲). فراوانی این ژن در بین ۵۷ سوبه سودوموناس آئروژینوزا مورد مطالعه توسط Banar و همکاران ۱۰۰ درصد بود (۱۳). هم‌چنین، در سایر مطالعات انجام شده توسط Namuq و همکاران، قدک ساز و همکاران و Zaranza و همکاران، فراوانی ژن *algD* به ترتیب ۹۸، ۸۷/۵ و ۳۹ درصد گزارش شده است (۲۳-۲۱). از طرفی دیگر، از مجموع ۱۰۰ ایزوله بالینی سودوموناس آئروژینوزا جمع‌آوری شده در مطالعه حاضر، به ترتیب ۲، ۲، ۹۴ و ۲ ایزوله بالینی دارای رنگدانه قهوه‌ای، سبز-آبی، سبز و زرد بودند. تمامی ایزوله‌های بالینی دارای رنگدانه قهوه‌ای و سبز-آبی حاوی ژن *algD* نیز بودند، و از مجموع ۹۴ ایزوله دارای رنگدانه سبز، یک ایزوله و از مجموع ۲ ایزوله دارای رنگدانه زرد نیز یک ایزوله فاقد ژن *algD* بودند ( $P < 0/05$ ). با این حال، در هیچ یک از مطالعات پیشین، ارتباط بین بروز انواع رنگدانه و ژن‌های ویروالانس سودوموناس آئروژینوزا بررسی نشده بود. تنها در مطالعه Al Dawodeyah و همکاران اشاره شده است که شیوع ژن‌های ویروالانس *algD* *dasB*

تعداد ایزوله‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها



نمودار شماره ۱: نمودار الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا

جدول شماره ۱: بررسی ارتباط بین حضور ژن *algD* و بروز مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه

ویژگی مقاومت	حضور ژن <i>algD</i>	پیراسیلین (تعداد (درصد))	آزترونام (تعداد (درصد))	سفنازیدیم (تعداد (درصد))	ایمی پنم (تعداد (درصد))	توبرامایسین (تعداد (درصد))	سیپروفلوکساسین (تعداد (درصد))
حساس	بله	(۹۶/۲۲) ۵۱	(۹۲/۸۵) ۲۶	(۹۷/۱۸) ۶۹	(۹۶/۷۲) ۵۹	(۹۶/۶۶) ۵۸	(۹۶/۴۲) ۵۴
نسبتاً مقاوم	خیر	(۳/۷۸) ۲	(۷/۱۴) ۲	(۲/۸۱) ۲	(۳/۲۷) ۲	(۳/۳۳) ۲	(۳/۵۷) ۲
مقاوم	بله	(۱۰۰) ۲۶	(۱۰۰) ۳۳	(۱۰۰) ۲	(۱۰۰) ۸	(۱۰۰) ۱	(۱۰۰) ۳
خیر	خیر	.	.	.	.	.	.
سطح معنی‌داری	مقاوم	(۱۰۰) ۲۱	(۱۰۰) ۳۹	(۱۰۰) ۲۷	(۱۰۰) ۳۱	(۱۰۰) ۳۹	(۱۰۰) ۴۱
خیر	خیر	.	.	.	.	.	.
		۰/۴۰۵	۰/۰۷۳	۰/۶۵۹	۰/۵۲۱	۰/۵۰۶	۰/۴۴۹

در غالب ایزوله های بالینی سویه ی سودوموناس آئروژینوزا تهیه شده از مراکز آموزشی درمانی مازندران وجود دارد. از سوی دیگر شیوع بالای این ارگانسیم و مقاومت بالای آنتی بیوتیکی و چند دارویی که در مطالعه حال حاضر و مطالعات پیشین مشاهده شده است، درمان عفونت های ناشی از سودوموناس آئروژینوزا را به مشکلی جدی و پیچیده در مراکز درمانی تبدیل نموده است. در آخر با توجه به این که ژن *algD* در تشکیل بیوفیلم و مقاومت آنتی بیوتیکی نقش بسزایی دارد نتایج مطالعه حال حاضر نیز این یافته را تایید می کند.

### سپاسگزاری

این تحقیق منتج از پایان نامه دانشجوی دکتری حرفه ای در رشته پزشکی بود و توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مازندران با کد اخلاق IR.MAZUMS..REC.1401.359 مورد تصویب قرار گرفت. از معاونت تحقیقات دانشگاه برای تأمین هزینه مطالعه، تشکر و قدردانی می گردد.

در مطالعه ی Bazghandi و همکاران، ۵۷/۱ درصد، ۴۶/۵ درصد، ۴۲/۹ درصد، ۶۶/۷ درصد و ۵۴/۸ درصد ایزوله ها، به ترتیب نسبت به پیراسیلین، سفنازیدیم، آزترونام، ایمپنم و سیپروفلوکساسین مقاوم بودند (۲۶). در مطالعه شهاب زاده و همکاران، به ترتیب ۴۶، ۶۸/۷ و ۴۳/۷ درصد از ایزوله ها نسبت به سیپروفلوکساسین، سفنازیدیم و ایمپنم مقاوم بودند (۲۷).

در مطالعه Silva و همکاران، به ترتیب ۶/۲۳، ۱۵/۶، ۳۷/۵، ۳۴/۴ و ۶/۲۵ درصد از ایزوله ها به ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶ کلاس از آنتی بیوتیک ها مقاومت نشان داده بودند (۲۸). در مطالعه حاضر نیز غالب ایزوله های بالینی سودوموناس آئروژینوزا به آنتی بیوتیک های مورد مطالعه مقاومت داشتند، در حالی که اکثر ایزوله های بالینی مقاوم حامل ژن *algD* بودند.

از محدودیت های مطالعه می توان به، عدم انجام تست آنتی بیوگرام برای آنتی بیوتیک های بیش تر و عدم بررسی ژن های دیگر دخیل در تولید کپسول، اشاره کرد. نتایج مطالعه حال حاضر نشان می دهد که ژن *algD*

### References

- Ahmadian L, Haghshenas MR, Mirzaei B, Khalili Y, Goli HR. Role of MexAB-OprM efflux pump in the emergence of multidrug-resistant clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa in Mazandaran province of Iran. Mol Biol Rep 2023; 50(3): 2603-2609.
- Abdelraheem WM, Abdelkader AE, Mohamed ES, Mohammed MS. Detection of biofilm formation and assessment of biofilm genes expression in different Pseudomonas aeruginosa clinical isolates. Meta Gene 2020; 23: 100646.
- Azam MW, Khan AU. Updates on the pathogenicity status of Pseudomonas aeruginosa. Drug Discov Today 2019; 24(1): 350-359.
- Phillips PL, Schultz GS. Molecular Mechanisms of Biofilm Infection: Biofilm Virulence Factors. Adv Wound Care 2012; 1(3): 109-114.
- Reynolds D, Kollef M. The Epidemiology and Pathogenesis and Treatment of Pseudomonas aeruginosa Infections: An Update. Drugs 2021; 81(18): 2117-2131.
- Laverty G, Gorman SP, Gilmore BF. Biomolecular Mechanisms of Pseudomonas aeruginosa and Escherichia coli Biofilm Formation. Pathogens 2014; 3(3): 596-632.
- Govan JR, Deretic V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid Pseudomonas aeruginosa and Burkholderia cepacia. Microbiol Rev 1996; 60(3): 539-574.
- Barron E, Peterson L, Fingold S. Baily&Scott. Diagnostic Microbiology 1986; 7: 650.
- CLSI. Clinical and laboratory standards

- institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 33rd ed. CLSI supplement M100-S33 (ISBN 978-1-68440-171-0; 2023. 2023).
10. Šipošová NŠ, Liptáková V, Kvasnová S, Kosorínová P, Pristaš P. Genetic diversity of *Acinetobacter* spp. adapted to heavy metal polluted environments. *Nova Biotechnologica Et Chimica* 2017; 16(1): 42-47.
  11. Lanotte P, Watt S, Mereghetti L, Dartiguelongue N, Rastegar-Lari A, Goudeau A, et al. Genetic features of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients compared with those of isolates from other origins. *J Med Microbiol* 2004; 53(Pt 1): 73-81.
  12. Rajabi H, Salimizand H, Khodabandehloo M, Fayyazi A, Ramazanzadeh R. Prevalence of *algD*, *pslD*, *pelF*, *Ppgl*, and *PAPI-1* Genes Involved in Biofilm Formation in Clinical *Pseudomonas aeruginosa* Strains. *BioMed Res Int* 2022; 2022: 1716087.
  13. Banar M, Emaneini M, Satarzadeh M, Abdollahi N, Beigverdi R, Leeuwen WB, et al. Evaluation of Mannosidase and Trypsin Enzymes Effects on Biofilm Production of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Burn Wound Infections. *PloS One* 2016; 11(10): e0164622.
  14. Kamali E, Jamali A, Ardebili A, Ezadi F, Mohebbi A. Evaluation of antimicrobial resistance, biofilm forming potential, and the presence of biofilm-related genes among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Research Notes* 2020; 13(1): 27.
  15. Al-Hasan MN, Wilson JW, Lahr BD, Eckel-Passow JE, Baddour LM. Incidence of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: a population-based study. *Am J Med* 2008; 121(8): 702-708.
  16. Khan JA, Iqbal Z, Rahman SU, Farzana K, Khan A. Report: prevalence and resistance pattern of *Pseudomonas aeruginosa* against various antibiotics. *Pak J Pharm Sci* 2008; 21(3): 311-315.
  17. Fazeli N, Momtaz H. Virulence Gene Profiles of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolated From Iranian Hospital Infections. *Iran Red Crescent Med J* 2014; 16(10): e15722.
  18. Tingpej P, Smith L, Rose B, Zhu H, Conibear T, Al Nassafi K, et al. Phenotypic characterization of clonal and nonclonal *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from lungs of adults with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2007; 45(6): 1697-1704.
  19. West SE, Zeng L, Lee BL, Kosorok MR, Laxova A, Rock MJ, et al. Respiratory infections with *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis: early detection by serology and assessment of risk factors. *JAMA* 2002; 287(22): 2985-2967.
  20. Vincent JL, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, et al. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA* 2009; 302(21): 2323-2329.
  21. Ghadaksaz A, Fooladi AAI, Hosseini HM, Amin M. The prevalence of some *Pseudomonas* virulence genes related to biofilm formation and alginate production among clinical isolates. *Journal of Applied Biomedicine* 2015; 13(1): 61-68.
  22. Namuq AO, Ali KOM, Al-Ani AH. Correlation between biofilm formation, multi-drug resistance and *AlgD* gene among *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Journal of University of Babylon for Pure and Applied Sciences* 2019; 27(3): 143-150.

23. Zaranza AV, Morais FC, do Carmo MS, de Mendonça Marques A, Andrade-Monteiro C, Ferro TF, et al. Antimicrobial susceptibility, biofilm production and adhesion to HEp-2 cells of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical samples. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology* 2013; 04(01): 98-106.
24. Al Dawodeyah HY, Obeidat N, Abu-Qatouseh LF, Shehabi AA. Antimicrobial resistance and putative virulence genes of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with respiratory tract infection. *Germs* 2018; 8(1): 31-40.
25. Vaez H, Salehi-Abargouei A, Ghalehnoo ZR, Khademi F. Multidrug Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Iran: A Systematic Review and Metaanalysis. *J Global Infect Dis* 2018; 10(4): 212-217.
26. 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 ClinicalSpecimens. *Jundishapur J Microbiol* 2021; 14(8): e118452.
27. Shahbazzadeh M, Moazamian E, Rafati A, Fardin M. Antimicrobial resistance pattern, genetic distribution of ESBL genes, biofilm-forming potential, and virulence potential of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from the burn patients in Tehran Hospitals, Iran. *Pan Afr Med J* 2020; 36: 233.
28. Silva A, Silva V, López M, Rojo-Bezares B, Carvalho JA, Castro AP, et al. Antimicrobial Resistance, Genetic Lineages, and Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Human Infections: An Emerging One Health Concern. *Antibiotics* 2023; 12(8): 1248.