Avicenna Journal of Clinical Medicine No 88, Volume 25, Issue 2, Summer 2018, Pages: 112-120

Original Article

doi: 10.21859/ajcm.25.2.112

Investigation of the Relationship between the Presence of Genes Producing Toxin and Antibiotic Resistance Pattern in *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Burn Wounds

Fakhredin Maleki[1], Hamed Tahmasebi[2], Masud Zandi[3], Mohammad Reza Arabestani[4,*]

[1] *MSc in Microbiology, Hamadan Branch, Islamic Azad University, Hamadan, Iran*
[2] *MSc in Microbiology, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran*
[3] *Assistant Professor, Department of Nursing and Midvifery, Tuyserkan Branch, Islamic Azad University, Tuyserkan, Iran*
[4] *Associate Professor, Department of Microbiology, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran*

**** Corresponding Author:*** *Mohammad Reza Arabestani, Department of Microbiology, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran. Email: mohammad.arabestani@gmail.com*

Received: 06.05.2018
Accepted: 14.08.2018

How to Cite this Article:
Maleki F, Tahmasebi H, Zandi M, Arabestani MR. Investigation of the Relationship between the Presence of Genes Producing Toxin and Antibiotic Resistance Pattern in *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Burn Wounds. *Avicenna J Clin Med*. 2018; 25(2): 112-120. DOI: 10.21859/ajcm.25.2.112

Abstract

Background and Objective: Secreted toxins of the burn wounds caused by *Pseudomonas aeruginosa* play an important role in spreading infection. The antibiotic resistance pattern may have an effect on the increased toxicity of this bacterium. Therefore, the aim of this study was to determine the relationship between the presence of *P. aeruginosa* toxins isolated from burn wounds and the antibiotic resistance pattern.

Materials and Methods: In this cross sectional-descriptive study, *P. aeruginosa* isolates were first isolated from the burn wound samples by using biochemical tests. The next step dealt with the investigation of antibiotic resistance pattern based on CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). The process of identifying the genes responsible for producing toxin was performed by polymerase chain reaction method. Data analysis was performed in SPSS (version 16) using the Chi-square test.

Results: Out of 250 strains isolated from burn wounds, 63 isolates (25.2%) were obtained from *P. aeruginosa*. With regard to resistance, the obtained results revealed that Doripenem, Ertapenem, and Meropenem antibiotics had the highest frequency, whereas, the antibiotics of Piperacillin/Tazobactam and Piperacillin had the lowest frequency. Moreover, resistance to imipenem was observed to be semi-sensitive regarding the minimum inhibitory concentration in three isolates (76.4%). The *exoS*, *toxA*, *exoT*, *exoY*, and *pvdA* genes were observed in 40 (63.49%), 31(49.2%), 39 (61.9%), 56 (88.88%), and 50 (79.36%) isolates, respectively. In addition, there was a significant correlation between the antibiotic resistance pattern and distribution of toxin genes ($P < 0.05$).

Conclusion: According to the obtained results, it can be concluded that the antimicrobial resistance pattern could play an important role in the distribution of *P. aeruginosa* toxin genes isolated from burn wounds.

Keywords: Antibiotic Resistance, *Pseudomonas aeruginosa*, Toxin, Virulence Factors

Copyright © 2018 Avicenna Journal of Clinical Medicine

مقاله پژوهشی

doi: 10.21859/ajcm.25.2.112

بررسی ارتباط بین حضور ژن‌های تولیدکننده توکسین و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزای* جداشده از زخم سوختگی

فخرالدین ملکی[۱]، حامد طهماسبی[۲]، مسعود زندی[۳]، محمدرضا عربستانی[۴،*]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب‌شناسی، واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران

[۲] کارشناس ارشد میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران

[۳] استادیار، گروه پرستاری و مامایی، واحد تویسرکان، دانشگاه آزاد اسلامی، تویسرکان، ایران

[۴] دانشیار، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

* **نویسنده مسئول:** محمدرضا عربستانی، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران.

ایمیل: mohammad.arabestani@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۰۲/۱۶

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۰۵/۲۳

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی همدان محفوظ است.

چکیده

سابقه و هدف: توکسین‌های ترشح‌شده از زخم سوختگی ناشی از *سودوموناس آئروژینوزا* نقش مهمی در انتشار عفونت دارند و ممکن است الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی بر افزایش حالت توکسیسته این باکتری تأثیر داشته باشد. در این ارتباط، مطالعه حاضر با هدف تعیین ارتباط بین حضور توکسین‌های *سودوموناس آئروژینوزای* جداشده از زخم سوختگی و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی– مقطعی ابتدا ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* از نمونه زخم سوختگی با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی شناسایی شدند. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی براساس الگوی CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) مورد بررسی قرار گرفت. جهت شناسایی ژن‌های عامل تولیدکننده توکسین از روش PCR (Polymerase Chain Reaction) استفاده گردید. از نرم‌افزار SPSS 16 و آزمون مجذور کای نیز برای تجزیه و تحلیل آماری بهره گرفته شد.

یافته‌ها: از مجموع ۲۵۰ ایزوله جداشده از زخم سوختگی، ۶۳ ایزوله (۲۵/۲ درصد) *سودوموناس آئروژینوزا* به‌دست آمد. بر مبنای نتایج آنتی‌بیوتیک‌های دوری‌پنم، ارتاپنم و مروپنم دارای بیشترین فراوانی از نظر مقاومت بودند و آنتی‌بیوتیک‌های پیپراسیلین/تازوباکتام و پیپراسیلین کمترین فراوانی را به لحاظ مقاومت داشتند. علاوه‌براین، مقاومت به ایمی‌پنم با توجه به نتایج حداقل غلظت مهاری در ۳ ایزوله (۴/۷۶ درصد) به‌صورت نیمه‌حساس مشاهده شد. از سوی دیگر، ژن *exoS* در ۴۰ ایزوله (۶۳/۴۹ درصد)، ژن *toxA* در ۳۱ ایزوله (۴۹/۲ درصد)، ژن *exoT* در ۳۹ ایزوله (۶۱/۹ درصد)، ژن *exoY* در ۵۶ ایزوله (۸۸/۸۸ درصد) و ژن *pvdA* در ۵۰ ایزوله (۷۹/۳۶ درصد) مشاهده گردید. شایان ذکر است که ارتباط معناداری بین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و پراکنش ژن‌های توکسین به‌دست آمد ($P<0/05$).

نتیجه‌گیری: نتایج نشان دادند که الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌تواند نقش مهمی در پراکنش ژن‌های عامل توکسین در ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزای* جداشده از زخم سوختگی داشته باشد.

واژگان کلیدی: توکسین، *سودوموناس آئروژینوزا*، عوامل بیماری‌زایی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی

مقدمه

سال‌ها قبل از آنکه *سودوموناس آئروژینوزا* شناخته شود، پزشکان مشاهده چرک متمایل به رنگ آبی- سبز را نشانه‌ای مهم برای وخیم‌بودن عفونت‌های پوستی و سوختگی تلقی می‌کردند. *سودوموناس آئروژینوزا* یک باکتری هوازی اجباری می‌باشد که در انواع مختلف محیط‌های کشت به سهولت رشد می‌کند و بویی شبیه به انگور دارد [۱،۲]. وجود سیستم ترشحی نوع III سبب شده است که این باکتری بتواند پنج آنزیم مهم شامل: توکسین‌های خارج سلولی T، U، S، Y و A را تولید کند و در کنار سایر عوامل بیماری‌زایی آن مانند پیلی و لیپوپلی ساکاریدی، آنزیم‌های خارج سلولی شامل: الاستاز، پروتئاز، فسفولیپاز C و رامنو لیپید سبب افزایش بیماری‌زایی باکتری شوند. سطح بالای مقاومت *سودوموناس آئروژینوزا* به

آنتی‌بیوتیک‌ها و گریز از سیستم ایمنی باعث انتشار این باکتری می‌گردد [۳،۴]. اگزوتوکسین A یکی از مهم‌ترین فاکتورهای بیماری‌زایی تولیدشده است؛ آنزیمی که از طریق غیرفعال‌کردن فاکتور طویل‌کننده ۲ باعث توقف سنتز پروتئین و در نهایت مرگ سلول می‌شود. علاوه‌براین، اگزوتوکسین A باعث تبدیل نیکوتین‌آمید دی‌نوکلئوتید به آدنوزین دی‌فسفات ریبوزیلات می‌گردد [۵]. اگزوتوکسین A دارای سه قسمت است: بخش I به گیرنده‌های سلولی میزبان متصل می‌شود و اندوسیتوز را پی‌ریزی می‌کند، بخش II موجب انتقال توکسین به درون سیتوپلاسم سلول می‌شود و بخش III آدنوزین دی‌فسفات ریبوزیلاسیون فاکتور طویل‌کننده ۲ را کاتالیز می‌کند [۶]. علاوه‌براین، اگزوآنزیم S پروتئین‌های سلولی میزبان را ریبوزیله می‌نماید. در میان پروتئین‌های هدف این آنزیم می‌توان به ویمنتین و چندین پروتئین دیگر که به گوانزین تری‌فسفات متصل می‌شوند اشاره کرد. *سودوموناس آئروژینوزا* از دو سیدروفور برای کسب آهن سه ظرفیتی ترانسفرین استفاده می‌کند [۷]. به دلیل اینکه باکتری به آهن نیاز دارد، باکتری‌هایی که نمی‌توانند آهن را کسب کنند قادر نخواهند بود به بافت میزبان هجوم ببرند. اگزوآنزیم T و S اولین آنزیم‌های شناخته‌شده در این گروه هستند [۸]. اگزوآنزیم T هنگام انتشار و فرار پاتوژن تولید می‌شود. هر دوی این اگزوآنزیم‌ها فعالیت ADP-ribosyltransferase دارند و از نظر پاتولوژی مشابه با توکسین کلرا عمل می‌کنند [۹،۱۰]. تولید اگزوآنزیم Y نیز اثر نسبتاً کمی بر پنومونی موش و اثر معناداری بر سایتوتوکسیتی سلول‌های MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) دارد. اثر کشندگی اگزوآنزیم U بر سلول‌های MDCK حدود ۱۱۱ برابر اگزوآنزیم T تخمین زده شده است. باید خاطرنشان ساخت که حذف اگزوآنزیم U باعث کاهش اثر پاتوژن در ریه می‌شود [۱۰]. ژن pvdA یکی از مهم‌ترین ژن‌ها در ساخت آنزیم ال-اورنیتین N5-اوکسیژناز است که به‌عنوان یک آنزیم کاتالازی در تنظیم و کنترل مسیرهای بیوسنتزی در *سودوموناس آئروژینوزا* دخالت دارد. فعالیت این ژن با تأثیر بر برخی از مسیرهای جذب آهن به‌عنوان یکی از کنترل‌کننده‌های مهم جذب آهن در باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* به شمار می‌رود [۱۱].

مقاومت به چند آنتی‌بیوتیک در *سودوموناس آئروژینوزا* یکی از مهم‌ترین مواردی می‌باشد که در سال‌های اخیر مشکلات فراوانی را برای بیماران بستری در بیمارستان، به‌ویژه بیماران دچار زخم سوختگی ایجاد کرده است. توکسین‌های خارج سلولی در برخی از موارد می‌توانند تحت تأثیر الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی تغییر کنند و با مقاومت به چند دارو زمینه‌ساز افزایش تولید توکسین شوند [۱۲،۱۳]. علاوه‌براین، برخی از متغیرها می‌توانند سبب ایجاد تغییراتی ساختاری در باکتری شوند و زمینه بیماری‌زاشدن و یا مقاوم‌شدن آن را فراهم کنند [۱۴]. در برخی از مطالعات صورت‌گرفته شواهدی مبنی بر وجود یک ارتباط نامنظم بین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و برخی از عوامل بیماری‌زایی در *سودوموناس آئروژینوزا* ارائه شده است. شن و همکاران (۲۰۱۵) و برخی از پژوهشگران دیگر بیان کرده‌اند که ارتباط مستقیمی بین حضور ژن‌های عامل توکسین و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* وجود دارد. این درحالی می‌باشد که ایزوله‌های جداشده از نمونه‌های زخم بیماران دچار سوختگی توسط این باکتری کمتر مورد توجه قرار گرفته است و با توجه به حضور متغیرهای متنوع در بروز مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی نمونه‌های زخم سوختگی، این احتمال وجود دارد که چالش سخت‌تری را در زمینه درمان این بیماران ایجاد کند [۱۵،۱۶].

با توجه به اهمیت موارد بیان‌شده، پژوهش حاضر با هدف تعیین ارتباط بین حضور ژن‌های توکسین *سودوموناس آئروژینوزای* جداشده از زخم سوختگی و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی انجام شد تا بدین‌وسیله بتوان راه‌کار مناسبی را برای مقابله با سویه‌های دارای مقاومت چندگانه و تولیدکننده توکسین ارائه نمود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه و جداسازی باکتری‌ها

در این مطالعه توصیفی- مقطعی ۲۵۰ ایزوله جداشده از زخم سوختگی در محدوده زمانی نه ماه از بهمن ۱۳۹۵ تا آذر ۱۳۹۶ از بیماران بستری در بخش سوختگی مراکز منتخب درمانی دانشگاه علوم پزشکی همدان جمع‌آوری شد. مبنای نمونه‌گیری براساس نمونه‌گیری آسان و در دسترس پایه‌ریزی گردید. نمونه‌گیری در میان بیماران دچار سوختگی انجام شد و افرادی که زخم سوختگی نداشتند از مطالعه خارج شدند. به‌منظور جداسازی باکتری *سودوموناس* از آزمون‌های بیوشیمیایی نظیر رشد در محیط مک‌کانکی آگار، محیط ستریماید آگار، عدم تخمیر گلوکز و لاکتوز در محیط TSI (Triple Sugar Iron)، تولید اکسیداز، مصرف قند از طریق اکسیداسیون در محیط OF (Oxidative-Fermentative)، رشد در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد، تولید پیگمان و حرکت استفاده گردید. شایان ذکر است که ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* با استفاده از ژن *oprD* تأیید شدند [۱۷].

تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سودوموناس آئروژینوزا

بدین‌منظور از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی ایمی‌پنم (۱۰ میکروگرم)، مروپنم (۱۰ میکروگرم)، ارتاپنم (۱۰ میکروگرم)، دوری‌پنم (۱۰ میکروگرم)، سفتریاکسون (۳۰ میکروگرم)، سفپیم (۳۰ میکروگرم)، پیپراسیلین (۱۰ میکروگرم)، پیپراسیلین/ تازوباکتام (۱۰/۱۰۰ میکروگرم)، آزترئونام (۳۰ میکروگرم)،

آمیکاسین (۳۰ میکروگرم)، سفکسیم (۵ میکروگرم)، سفپودوکسیم (۱۰ میکروگرم) و تیکارسیلین (۷۵ میکروگرم) (MAST، انگلستان) به روش دیسک دیفیوژن استفاده گردید [۱۸-۲۱]. به‌منظور تعیین قطر هاله سویه‌های مورد بررسی نیز از CLSI 2017 بهره گرفته شد [۲۲].

تعیین حداقل غلظت مهاری به روش E-test (Epsilometer Test): در این مطالعه جهت مشخص‌کردن حداقل غلظت مهاری نسبت به آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم از نوار E-test (Liofilchem، ایتالیا) استفاده شد و نتایج به‌دست‌آمده با استفاده از CLSI 2017 مورد بررسی قرار گرفت [۲۲].

استخراج ژنومی با استفاده از کیت استخراج

برای انجام استخراج DNA ژنومیک از کیت استخراج سینا کلون (مخصوص باکتری‌های گرم منفی، سینا کلون- ایران) استفاده شد. بدین‌منظور، پس از کشت اولیه بر روی محیط ستریماید آگار (Merck، آلمان) و گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۴۲ درجه سلسیوس، کلنی‌های به‌دست‌آمده داخل محیط لوریا برتانی براث (Merck، آلمان) تلقیح گردیدند و پس از ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، مراحل با توجه به پروتکل کیت مورد استفاده انجام شدند. شایان ذکر است که DNA به‌دست‌آمده پس از تعیین کیفیت و کمیت به‌منظور انجام آزمون‌های مولکولی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره گردید.

آماده‌سازی پرایمرها و انجام PCR

پرایمرهای مورد استفاده پس از رقیق‌سازی با غلظت ۱۰ پیکومولار برای تهیه مخلوط PCR آماده گردیدند. حجم نهایی واکنش PCR ۲۵ میکرولیتر در نظر گرفته شد که شامل: ۱ میکرولیتر از DNA الگو، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۱۰ پیکومولار و ۱۲ میکرولیتر از مسترمیکس (Ampliqon، آلمان) بود. برای جبران حجم باقی‌مانده از آب مقطر دیونیزه استفاده گردید و برای تکثیر ژن‌های مورد مطالعه از ترموسایکلر (BioRad C1001، آمریکا) بهره گرفته شد. ویژگی‌ها و چرخه‌های دمایی برای تکثیر ژن‌های مورد مطالعه در جدول ۱ ارائه شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، واسرشت‌سازی اولیه برای تمامی پرایمرها در دمای ۹۶ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه و طویل‌سازی نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۸ دقیقه ثبت گردیده است.

الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد

۵ میکرولیتر از محصول نهایی PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر X ۰/۵ الکتروفورز گردید و از مارکر bp ۱۰۰ فرمنتاز (Thermofisher، آمریکا) برای شناسایی باند مورد نظر استفاده

جدول ۱: لیست پرایمرها و تنظیمات دمایی مورد استفاده جهت تکثیر ژن‌های توکسین‌های خارج سلولی سودوموناس آئروژینوزای جداشده از زخم سوختگی

ژن‌های مورد نظر	طول توالی	اندازه (bp)	تعداد سیکل (شرایط دمایی)	رفرنس
exoA	F: CTGCGCGGGTCTATGTGCC R: GATGCTGGACGGGTCGAG	۲۷۰	۳۰ (۱ دقیقه در دمای ۹۶ درجه سلسیوس؛ ۱ دقیقه در دمای ۵۸ درجه سلسیوس؛ ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس)	[۲۳]
exoS	F: CGTCGTGTTCAAGCAGATGGTGCTG R: CCGAACCGCTTCACCAGGC	۴۴۴	۳۰ (۱ دقیقه در دمای ۹۶ درجه سلسیوس؛ ۱ دقیقه در دمای ۵۶ درجه سلسیوس؛ ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس)	[۲۴]
exoT	F: CAATCATCTCAGCAGAACCC R: TGTCGTAGAGGATCTCCTG	۱۱۵۹	۳۰ (۱ دقیقه در دمای ۹۶ درجه سلسیوس؛ ۵۰ ثانیه در دمای ۵۵ درجه سلسیوس؛ ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس)	[۲۳]
exoY	F: TATCGACGGTCATCGTCAGGT R: TTGATGCACTCGACCAGCAAG	۱۰۳۵	۳۰ (۱ دقیقه در دمای ۹۶ درجه سلسیوس؛ ۱ دقیقه در دمای ۵۸ درجه سلسیوس؛ ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس)	[۲۳]
exoU	F: GATTCCATCACAGGCTCG R: CTAGCAATGGCACTAATCG	۳۳۰۸	۲۵ (۱ دقیقه در دمای ۹۶ درجه سلسیوس؛ ۱ دقیقه در دمای ۵۷ درجه سلسیوس؛ ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس)	[۲۳]
pvdA	F: GACTCAGGCAACTGCAAC R: TTCAGGTGCTGGTACAGG	۱۲۸۱	۳۰ (۱ دقیقه در دمای ۹۶ درجه سلسیوس؛ ۵۰ ثانیه در دمای ۵۵ درجه سلسیوس؛ ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس)	[۲۳]
oprD	F: GTCGATTACAGGATCGACAG R: GCCGACCACCGTCAAATCG	۱۴۱۲	۳۰ (۱ دقیقه در دمای ۹۶ درجه سلسیوس؛ ۱ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سلسیوس؛ ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس)	[۱۷]

شد. شایان ذکر است که در این پژوهش از سویه استاندارد *سودوموناس آئروژینوزای* ATCC 27853 و ATCC 14425 به‌عنوان کنترل مثبت و از سویه *سودوموناس آئروژینوزای* ATCC 15692 به‌عنوان کنترل منفی بهره گرفته شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

نتایج به‌دست‌آمده از تعیین مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی به روش فنوتیپی با استفاده از نرم‌افزار Excel 2013 بررسی و تجزیه و تحلیل شدند. همچنین، از نرم‌افزار SPSS 16 برای آنالیز داده‌ها و از آزمون آماری مجذور کای برای مقایسه یافته‌ها استفاده گردید. شایان ذکر است که سطح معناداری در این مطالعه معادل P≤۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

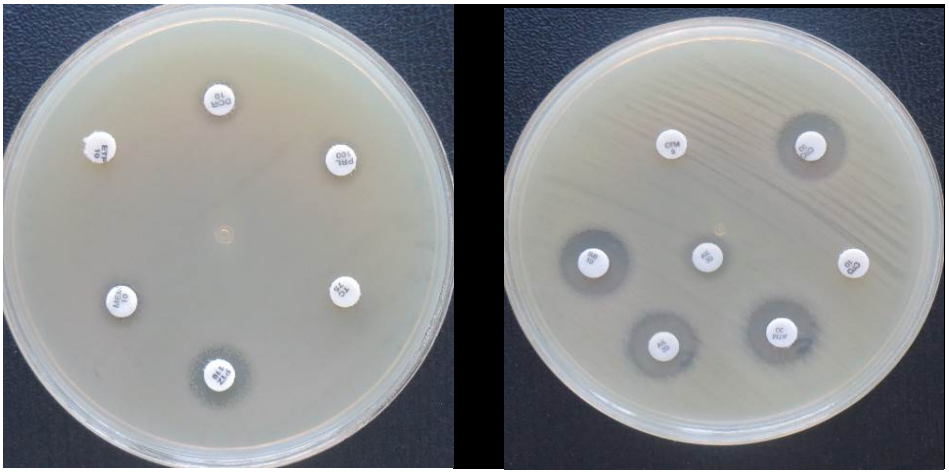
یافته‌ها

نتایج حاصل از جمع‌آوری ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا

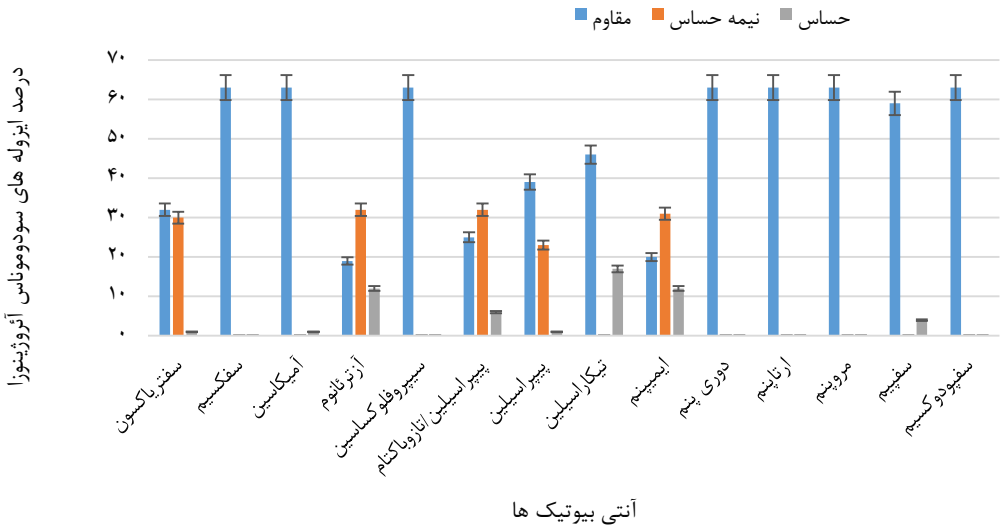
در مطالعه حاضر از مجموع ۲۵۰ ایزوله به‌دست‌آمده از زخم سوختگی در بیماران دچار سوختگی، ۶۳ ایزوله (۲۵/۲ درصد) به‌عنوان *سودوموناس آئروژینوزا* شناسایی شدند.

نتایج الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا

از مجموع ۶۳ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزای* جداشده از بیماران دچار سوختگی، آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم دارای کمترین فراوانی از نظر مقاومت و آنتی‌بیوتیک‌های دوری‌پنم، ارتاپنم و مروپنم دارای بیشترین فراوانی به لحاظ الگوی مقاومت بودند. بر مبنای نتایج، آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم در ۲۰ ایزوله (۳۱/۷۳ درصد) دارای مقاومت بود و تمامی ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزای مورد مطالعه به آنتی‌بیوتیک‌های دوری‌پنم، ارتاپنم و مروپنم مقاومت ۱۰۰ درصدی داشتند. علاوه‌براین، آنتی‌بیوتیک‌های سفکسیم و سفپودوکسیم دارای فراوانی ۱۰۰ درصد بودند و آنتی‌بیوتیک‌های پیپراسیلین/تازوباکتام و پیپراسیلین کمترین فراوانی الگوی مقاومت را داشتند (شکل‌های ۱ و ۲).



شکل ۱: الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزای* جداشده از زخم سوختگی



شکل ۲: الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزای جداشده از نمونه زخم سوختگی

نتایج حداقل غلظت مهاری به ایمی‌پنم ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا

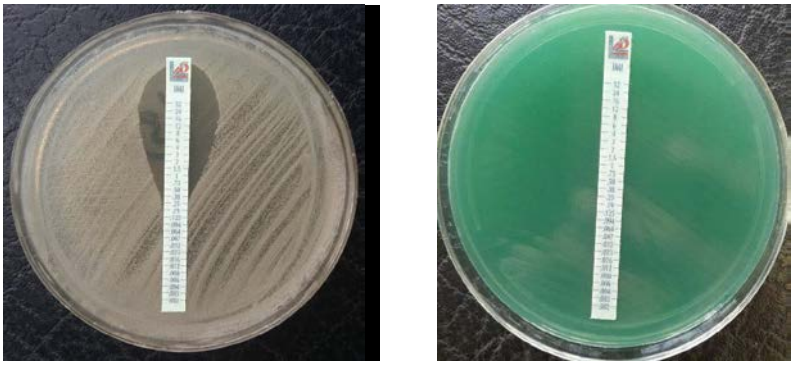
از مجموع ۶۳ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزای* جداشده از بیماران دچار سوختگی، ۳ ایزوله (۴/۷۶ درصد) دارای حداقل غلظت مهاری بین ۴ تا ۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر بودند و سایر ایزوله‌ها مقادیری بیشتر از ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر را از خود نشان دادند (شکل ۳).

نتایج فراوانی ژن‌های توکسین‌های خارج سلولی در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا

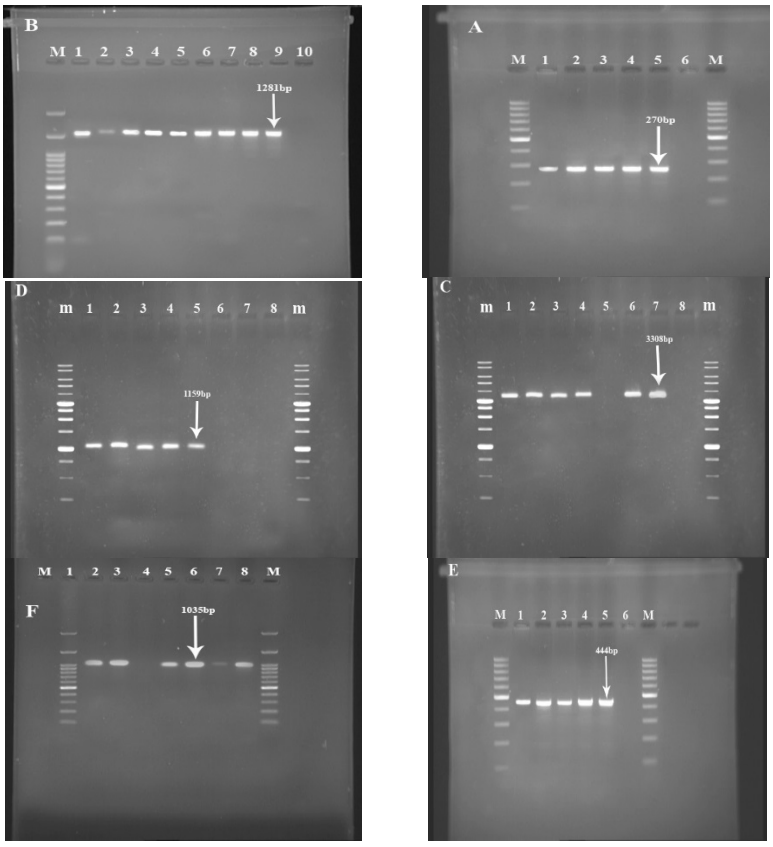
از ۶۳ ایزوله مورد بررسی، ژن exoS در ۴۰ ایزوله (۶۳/۴۹ درصد)، ژن *exoA* در ۳۱ ایزوله (۴۹/۲۰ درصد)، ژن *exoT* در ۳۹ ایزوله (۶۱/۹۰ درصد)، ژن *exoY* در ۵۶ ایزوله (۸۸/۸۸ درصد)، ژن *exoU* در ۱۴ ایزوله (۲۲/۲۲ درصد) و ژن *pvdA* در ۵۰ ایزوله (۷۹/۶۳ درصد) مشاهده گردید. علاوه‌براین، ارتباط معناداری بین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و حضور ژن‌های تولیدکننده توکسین به‌دست آمد (شکل ۴).

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری

با درنظرگرفتن P≤۰/۰۵ به‌عنوان سطح معناداری، ارتباط معناداری بین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و حضور ژن‌های عامل توکسین‌های خارج سلولی در *سودوموناس آئروژینوزای* جداشده از زخم سوختگی مشاهده گردید (جدول ۲).



شکل ۳: حداقل غلظت مهاری به آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم در ایزوله‌های حساس و مقاوم *سودوموناس آئروژینوزای* جداشده از زخم سوختگی



شکل ۴: نتایج حاصل از تکثیر ژن *exoA* با طول ۲۷۰ جفت باز (A)، ژن *pvdA* با طول ۱۲۸۱ جفت باز (B)، ژن *exoU* با طول ۳۳۰۸ جفت باز (C)، ژن *exoT* با طول ۱۱۵۹ جفت باز (D)، ژن *exoS* با طول ۴۴۴ جفت باز (E) و ژن exoY با طول ۱۰۳۵ جفت باز (D)
(چاهک M= مارکر ۱۰۰ جفت باز؛ چاهک m= مارکر ۱ کیلو جفت باز؛ چاهک ۱= کنترل مثبت؛ چاهک ۶ در A و E= کنترل منفی؛ چاهک ۱۰ در B= کنترل منفی؛ چاهک ۸ در C و D= کنترل منفی؛ چاهک ۴ در F= کنترل منفی)

جدول ۲: آنالیز آماری بررسی احتمال ارتباط بین مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ژن‌های عامل توکسین‌های خارج سلولی

آنتی‌بیوتیک	ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزای* حامل ژن‌های توکسین خارج سلولی				
	exoS	*toxA*	*exoT*	*exoY*	*pvdA*
ایمی‌پنم	P≤۰/۰۰۷	P≤۰/۰۰۰۳	P≤۰/۰۰۱	P≤۰/۰۰۷	P≤۰/۰۰۵
مروپنم	P≤۰/۰۰۱	P≤۰/۰۰۰۳	P≤۰/۰۰۱	P≤۰/۰۰۷	P≤۰/۰۱۵
ارتاپنم	P≤۰/۰۰۲	P≤۰/۰۰۵	P≤۰/۰۰۱	P≤۰/۰۰۷	P≤۰/۰۰۵
دوری‌پنم	P≤۰/۰۳۵	P≤۰/۰۰۲۳	P≤۰/۰۴۱	P≤۰/۰۱۵	P≤۰/۰۲۵
سفتریاکسون	P≤۰/۰۰۱	P≤۰/۰۰۱۳	P≤۰/۰۴۵	P≤۰/۰۳	P≤۰/۰۵
سفپیم	P≤۰/۰۴۵	P≤۰/۰۳۵	P≤۰/۰۱۷	P≤۰/۰۲۵	P≤۰/۰۱۱
پیپراسیلین	P≤۰/۰۳۷	P≤۰/۰۰۲۳	P≤۰/۰۴۴	P≤۰/۰۲۷	P≤۰/۰۱۵
پیپراسیلین/تازوباکتام	P≤۰/۰۲۱	P≤۰/۰۱۴	P≤۰/۰۴	P≤۰/۰۱۵	P≤۰/۰۳۹
آزترئونام	P≤۰/۰۰۵	P≤۰/۰۱	P≤۰/۰۴۷	P≤۰/۰۰۱۵	P≤۰/۰۴۱
آمیکاسین	P≤۰/۰۱۹	P≤۰/۰۰۴۳	P≤۰/۰۴۷	P≤۰/۰۱۷	P≤۰/۰۴۳
سفکسیم	P≤۰/۰۱۸	P≤۰/۰۱۱	P≤۰/۰۳۳	P≤۰/۰۴۵	P≤۰/۰۲۵
آمیکاسین	P≤۰/۰۱۱	P≤۰/۰۱۹	P≤۰/۰۱۷	P≤۰/۰۰۷	P≤۰/۰۰۳
سفپودوکسیم	P≤۰/۰۰۲	P≤۰/۰۰۵	P≤۰/۰۰۱	P≤۰/۰۰۷	P≤۰/۰۰۵
تیکاراسیلین	P≤۰/۰۰۹	P≤۰/۰۰۳	P≤۰/۰۷	P≤۰/۰۲	P≤۰/۰۳

بحث

در سال‌های اخیر، مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در *سودوموناس آئروژینوزا* به بیشترین مقدار خود رسیده است. ظهور سویه‌های دارای مقاومت چندگانه می‌تواند زنگ خطری برای گسترش سویه‌های خطرناک و مقاوم به درمان باشد. در مطالعه حاضر مقاومت به کلاس‌های مختلفی از آنتی‌بیوتیک‌ها از قبیل (دوری‌پنم، ارتاپنم و مروپنم) و آنتی‌بیوتیک‌های سفپیم، سفپودوکسیم و سفکسیم به‌صورت ۱۰۰ درصد مشاهده گردید. بررسی‌های صورت‌گرفته توسط جاویا و همکاران در سال ۲۰۰۸ و رنوگا و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان از گسترش سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* با مقاومت بالا به آنتی‌بیوتیک داشت؛ به‌طوری که در مطالعات ذکرشده، آنتی‌بیوتیک‌های گروه کارباپنماز و سفپیم در ۸۰ درصد از ایزوله‌های مورد بررسی دارای مقاومت کامل بودند. در پژوهش حاضر نیز همسو با این مطالعات، افزایش مقاومت به گروه‌های آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* تأیید می‌شود. دوو و همکاران نیز طی پژوهشی در سال ۲۰۱۷ نشان دادند که مقاومت به گروه‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی طی سال‌های مختلف روند افزایشی داشته است و در برخی از گروه‌های آنتی‌بیوتیکی، مقاومت با فراوانی بالا نیز مشاهده می‌شود [۱۸،۲۵،۲۶]. این درحالی است که در مطالعات هانوود و همکاران در سال ۲۰۰۱ و لین و همکاران در سال ۲۰۱۶، برخی از آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی دارای نتایج یکسانی نبودند. یکی از مهم‌ترین مسائلی که سبب ایجاد اختلاف در الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌گردد، جهش در باکتری‌های عامل عفونت بیمارستانی است که می‌تواند برخی از ژن‌های عامل مقاومت به گروه‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی را توسط عوامل متحرک ژنتیکی به سایر جنس‌ها و گونه‌های دیگر انتقال دهند [۱۹،۲۰].

شاید یکی از مسائلی که در شیوع ژن‌های عامل توکسین نقش مهمی دارد، حضور سویه‌های دارای مقاومت چندگانه باشد. در مطالعه حاضر بیش از ۴ درصد از سویه‌های مورد مطالعه مقاومت ۱۰۰ درصدی نسبت به تمامی آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی داشتند؛ بنابراین می‌توان آن‌ها را به‌صورت سویه‌های دارای مقاومت چندگانه در نظر گرفت. این سویه‌ها که دارای مقاومت به گروه‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی هستند، با آنتی‌بیوتیک‌های معمول از بین نمی‌روند و گاهی از نظر بیماری‌زایی دارای قدرت تخریب بیشتری می‌باشند. این درحالی است که در پژوهش حاضر نشان داده شد که فراوانی ژن‌های عامل بیماری‌زا از قبیل ژن‌های توکسینی در این سویه‌ها بیشترین تعداد را دارد. در مطالعات صورت‌گرفته توسط مهدوی و همکاران در سال ۱۳۹۱ و ولدبیگی و همکاران در سال ۱۳۹۶ مشخص شد که شیوع ژن‌ها در میان تمام نمونه‌های جداشده بدین‌صورت بوده است: *exoT* ۳۲/۷۶ درصد، *exoS* ۹۰/۳۰ درصد، *exoY* ۵۴/۱۴ درصد و *exoU* ۲۷/۶۷ درصد که ژن *exoU* در میان گونه‌های MDR (Multiple Drug Resistance) نسبت به بخش غیر MDR بالاتر (۳/۸۱ در مقابل ۶/۱۶ درصد) بوده است. میزان جدایه‌های exoU+ مقاوم به فلوروکینولون نسبت به نمونه‌های exoS+ مقاوم به فلوروکینولون نیز ۳۲ در مقابل ۱۷ درصد ثبت شده است. علاوه بر همخوانی نسبتاً نزدیک برخی از ژن‌های عامل توکسین در مطالعات ذکرشده، نتایج تمامی بررسی‌ها نشان‌دهنده این مهم می‌باشند که برخی از سویه‌های دارای مقاومت چندگانه، فراوانی بیشتری از نظر ژن‌های عوامل بیماری‌زایی دارند. نتایج به‌دست‌آمده از مطالعات ذکرشده بر این نکته تأکید می‌کنند که

برخی از سیستم‌های ترشحی در جهت حفظ بقای باکتری بسیار مؤثر هستند و می‌توانند زمینه ظهور سویه‌های مقاوم‌تر را فراهم سازند. این امر در باکتری‌هایی که در سطح ایجاد عفونت می‌کنند، به مراتب بیشتر به چشم می‌خورد؛ زیرا باکتری به‌منظور مقابله با عوامل خارجی و همچنین بالابردن قدرت انتشار در میزبان، حدت بیماری‌زایی خود را بیش از پیش افزایش می‌دهد تا با تخریب بافت سبب گسترده‌شدن عفونت گردد [۲۰،۲۷]. همخوانی این موارد با نتایج مطالعه حاضر از آن جهت است که جداسازی ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* از زخم، شرایط مناسبی را برای باکتری فراهم می‌کند که علاوه بر بیماری‌زاتربودن بتواند در برابر طیف گسترده‌تری از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت کند؛ زیرا به دلیل تولید و ترشح برخی از لایه‌های خارج سلولی، باکتری می‌تواند در برابر نفوذ و عملکرد آنتی‌بیوتیک مقاومت کرده و زنده بماند و حتی در دوزهای بالای آنتی‌بیوتیک وارد فاز تحمل (تولرانت) گردد. دامنه و گستردگی این موضوع در مطالعه حیدری و همکاران نیز مطرح شده است. در پژوهش آن‌ها فراوانی و حضور توکسین‌های مختلف در این باکتری گزارش گردید و بسیاری از اندوتوکسین‌های خطرناک مانند *exoT*، *exoS*، *exoY* و *exoU* در *سودوموناس آئروژینوزا* که می‌توانند در بیماران دچار عفونت‌های بیمارستانی خطرناک باشند، شناسایی شد [۲۸-۳۰].

علاوه‌براین، نتایج پژوهش حاضر نشان دادند که ارتباط معناداری بین حضور توکسین‌های خارج سلولی و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی وجود دارد؛ به‌طوری که سویه‌هایی که دارای مقاومت چندگانه بودند، بیشترین فراوانی ژن‌های توکسین‌های خارج سلولی را داشتند. زخم سوختگی می‌تواند شرایطی را فراهم کند که *سودوموناس آئروژینوزا* برای حفظ بقای خود مکانیسم‌های تنظیمی و متابولیکی خود را تغییر دهد. این تغییر به نحوی است که باکتری پس از تحمل شرایط محیطی و خروج از حالت تولرانت به‌منظور ازبین‌بردن سایر باکتری‌های موجود در زخم، مقابله با دزهای مختلف آنتی‌بیوتیکی، گسترش و تخریب بافت میزبان و افزایش عفونت‌زایی خود، ترشحات خارج سلولی خود را همراه با مقاومت آنتی‌بیوتیکی افزایش می‌دهد [۳۰]؛ زیرا این توکسین‌های خارج سلولی در برخی از موارد می‌توانند سبب افزایش تولید آلژینات، بیوفیلم و پدیده کروم سنسینگ که عواملی محافظتی برای باکتری به شمار می‌روند، گردند. در این راستا، وانگ و همکاران در سال ۲۰۱۶ در یک مطالعه سیستمیک بیان کردند که بروز مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی می‌تواند شرایط بیماری‌زایی باکتری را دست‌خوش تغییر قرار دهد. در حقیقت، نوعی ارتباط مستقیم بین بیماری‌زایی و نوع الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی وجود دارد [۳۱]. در مقابل، شن و همکاران در سال ۲۰۱۵ و ارتوگرول و همکاران در سال ۲۰۱۷ در مطالعات خود عنوان نمودند که ارتباط مستقیمی بین حضور ژن‌های عامل توکسین و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* وجود ندارد. در این دو مطالعه با توجه به حساسیت قابل توجه ایزوله‌های مورد بررسی و بالابودن فراوانی سویه‌های با قابلیت بیماری‌زایی، دو متغیر مقاومت آنتی‌بیوتیکی و بیماری‌زایی باکتری فاقد ارتباط معناداری بودند [۱۵،۳۲]. با توجه به شرایط حاکم بر پژوهش حاضر و محدودیت در جامعه مورد مطالعه، بسط این موضوع که بین مقاومت آنتی‌بیوتیکی و بیماری‌زایی باکتری ارتباط معناداری وجود دارد، نیازمند تحقیق و بررسی‌های گسترده‌تری می‌باشد. باید خاطرنشان ساخت که نوع نمونه بالینی، جنسیت، سن و حتی مناطقی که ایزوله‌های بالینی از آن‌ها جدا شده‌اند می‌توانند نقش مهمی در این فرایند داشته باشند. این ارتباط در ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزای* جداشده از نمونه‌های زخم بیماران دچار سوختگی ممکن است تحت تأثیر متغیرهای مختلفی قرار گیرد و موجب ایجاد تفاوت‌های گسترده در مطالعات مختلف شود؛ از این رو، به‌منظور افزایش این احتمال در ایزوله‌های زخم سوختگی لازم است مطالعات متمرکزتری صورت پذیرد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه مشخص شد که ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزایی* که دارای مقاومت چندگانه هستند، می‌توانند بیماری‌زایی و تخریب بیشتری را در بافت‌های سطحی از خود نشان دهند و با ترشح توکسین، انتشار خود به سایر بافت‌ها را تسهیل نمایند؛ از این رو با درنظرگرفتن این موضوع، سویه‌های دارای مقاومت چندگانه را باید با دقت بیشتری مورد درمان قرار داد تا بدین‌وسیله از بروز شوک‌های توکسیک جلوگیری گردد.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر حاصل طرح تحقیقاتی هیأت علمی با شماره ۹۵۱۰۰۷۵۷۵۷ و کد اخلاقی IR.UMSHA.REC.1395.402 در سال ۱۳۹۵می‌باشد که با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی همدان و دانشگاه آزاد واحد همدان انجام شده است. بدین‌وسیله نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت‌های محترم و کارکنان آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی همدان ابراز می‌دارند. شایان ذکر می‌باشد که هیچ‌گونه تعارض منافعی در انجام این مطالعه وجود نداشته است.

REFERENCES

1. Turner KH, Everett J, Trivedi U, Rumbaugh KP, Whiteley M. Requirements for Pseudomonas aeruginosa acute burn and chronic surgical wound infection. *PLoS Genet*. 2014; **10**(7):e1004518. PMID: 25057820 DOI: 10.1371/journal.pgen.1004518
2. Mulcahy LR, Isabella VM, Lewis K. Pseudomonas

aeruginosa biofilms in disease. *Microb Ecol*. 2014;**68**(1):1-12. PMID: 24096885 DOI: 10.1007/s00248-013-0297-x
3. Li N, Hu X, Liu Y, Wang Y, Wang Y, Liu J, et al. Systemic inflammatory responses and multiple organ dysfunction syndrome following skin burn wound and Pseudomonas aeruginosa infection in mice. *Shock*. 2013;**40**(2):152-9. PMID: 23707977 DOI: 10.1097/SHK.0b013e31829aef41
4. Staugas RE, Harvey DP, Ferrante A, Nandoskar M, Allison AC. Induction of tumor necrosis factor (TNF) and interleukin-1 (IL-1) by Pseudomonas aeruginosa and exotoxin A-induced suppression of lymphoproliferation and TNF, lymphotoxin, gamma interferon, and IL-1 production in human leukocytes. *Infect Immun*. 1992;**60**(8):3162-8. PMID: 1639487
5. Amirmozafari N, Fallah Mehrabadi J, Isazadieh K, Habibi A. Molecular analysis of exotoxin A associated with antimicrobial resistance of Pseudomonas aeruginosa strains isolated from patients in Tehran hospitals. *Iran J Med Microbiol*. 2015;**8**(4):36-43. [Persian]
6. Mashouf RY, Esmaeili R, Alikhani MY, Ghanbari M. Evaluation of exotoxin A gene and frequency of polymerase chain reaction sensitivity in detection of pseudomonas aeruginosa isolated from burn patients. *Tehran Univ Med J*. 2014;**72**(3):167-73. [Persian]
7. Rocha CL, Coburn J, Rucks EA, Olson JC. Characterization of Pseudomonas aeruginosa exoenzyme S as a bifunctional enzyme in J774A.1 macrophages. *Infect Immun*. 2003; **71**(9):5296-305. PMID: 12933877
8. Wu W, Jin Y, Bai F, Jin S. Pseudomonas aeruginosa. In: Tang YW, Sussman M, Liu D, Poxton I, Schwartzman J, editors. Molecular medical microbiology. 2nd ed. Boston: Academic Press; 2015. P. 753-67.
9. Barbieri JT, Sun J. Pseudomonas aeruginosa ExoS and ExoT. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 2004;**152**:79-92.
10. Aghaei SS, Javadi A, Sharifi Y, Morovvati A. Detection of exotoxin A, Y, T, U, S genes of pseudomonas aeruginosa isolates resistant to third-generation cephalosporins in clinical samples of hospitalized patients in hospitals of Qom city, Iran. *Qom Univ Med Sci J*. 2016;**10**(1):48-55. [Persian]
11. Leoni L, Ciervo A, Orsi N, Visca P. Iron-regulated transcription of the pvdA gene in Pseudomonas aeruginosa: effect of Fur and PvdS on promoter activity. *J Bacteriol*. 1996;**178**(8):2299-313.
12. Tahmasebi H, Yousef Alikhani M, Dehbashi S, Arabestani MR. Investigation of the relationship between the presence of chromosomal and plasmid-encoded ampc genes and type of clinical specimen in pseudomonas aeruginosa. *J Babol Univ Med Sci*. 2018;**20**(3):36-43.
13. Gonzalez MR, Fleuchot B, Lauciello L, Jafari P, Applegate LA, Raffoul W, et al. Effect of human burn wound exudate on pseudomonas aeruginosa virulence. *mSphere*. 2016;**1**(2):e00111-15. PMID: 27303724 DOI: 10.1128/mSphere.00111-15
14. Tahmasebi H, Dehbashi S, Arabestani MR. Identification of gene mutation patterns obtained from resistance to mupirocin in methicillin-resistant staphylococcus aureus clinical strains, using high-resolution melting (HRM) method. *J Isfahan Med Sch*. 2018;**36**(476):403-10.
15. Shen EP, Hsieh YT, Chu HS, Chang SC, Hu FR. Correlation of Pseudomonas aeruginosa genotype with antibiotic susceptibility and clinical features of induced central keratitis. *Invest Ophthal Vis Sci*. 2015;**56**(1):365-71. PMID: 25537202 DOI: 10.1167/iovs.14-15241
16. Bien J, Sokolova O, Bozko P. Characterization of virulence factors of staphylococcus aureus: novel function of known virulence factors that are implicated in activation of airway epithelial proinflammatory response. *J Pathog*. 2011; **2011**:13. PMID: 22567334 DOI: 10.4061/2011/601905
17. Rodríguez-Martínez JM, Poirel L, Nordmann P. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in Pseudomonas aeruginosa. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;**53**(11):4783-8. PMID: 19738025 DOI: 10.1128/AAC.00574-09
18. Dou Y, Huan J, Guo F, Zhou Z, Shi Y. Pseudomonas aeruginosa prevalence, antibiotic resistance and antimicrobial use in Chinese burn wards from 2007 to 2014. *J Int Med Res*. 2017;**45**(3):1124-37. PMID: 28443385 DOI: 10.1177/0300060517703573
19. Henwood CJ, Livermore DM, James D, Warner M, Pseudomonas Study Group. Antimicrobial susceptibility of Pseudomonas aeruginosa: results of a UK survey and evaluation of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy disc susceptibility test. *J Antimicrob Chemother*. 2001;**47**(6):789-99. PMID: 11389111
20. Lin KY, Lauderdale TL, Wang JT, Chang SC. Carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa in Taiwan: Prevalence, risk factors, and impact on outcome of infections. *J Microbiol Immunol Infect*. 2016;**49**(1):52-9. PMID: 24662016 DOI: 10.1016/j.jmii.2014.01.005
21. Hettiarachchi I, Dhillon RP, Wootton M. 120 The prevalence of ticarcillin hypersusceptible Pseudomonas aeruginosa isolates from cystic fibrosis patients compared to non-cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros*. 2015;**14**(Suppl 1):S87. DOI: 10.1016/S1569-1993(15)30297-6
22. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 27th informational supplement, CLSI M100-S27. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.
23. Finnan S, Morrissey JP, O'Gara F, Boyd EF. Genome diversity of pseudomonas aeruginosa isolates from cystic fibrosis patients and the hospital environment. *J Clin Microbiol*. 2004;**42**(12):5783-92. PMID: 15583313 DOI: 10.1128/JCM.42.12.5783-5792.2004
24. 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. PMID: 25763199 DOI: 10.5812/ircmj.15722
25. Javiya VA, Ghatak SB, Patel KR, Patel JA. Antibiotic susceptibility patterns of Pseudomonas aeruginosa at a tertiary care hospital in Gujarat, India. *Indian J Pharmacol*. 2008;**40**(5):230-4. PMID: 20040963 DOI: 10.4103/0253-7613.44156
26. Renuga S, Lakshmi K, Chitralekha S, Illamani V. Prevalence of Pseudomonas aeruginosa and its antibiotic susceptibility pattern in a Tertiary Care Hospital. *Int J Pharm Sci Drug Res*. 2015;**6**(1):27-30.
27. Schiavano GF, Carloni E, Andreoni F, Magi S, Chironna M, Brandi G, et al. Prevalence and antibiotic resistance of Pseudomonas aeruginosa in water samples in central Italy and molecular characterization of oprD in imipenem resistant isolates. *PloS One*. 2017;**12**(12):e0189172. PMID: 29211780 DOI: 10.1371/journal.pone.0189172
28. Mahdavi M, Zahraei Salehi T, Amini K, Mobasseri P. Frequency of exoY, exoS, exoT and exoU genes among Pseudomonas aeruginosa Isolated from patients in Tehran hospitals by Multiplex PCR. *Iran J Microbiol*. 2017;**11**(1):9-17. [Persian]
29. Heidary Z, Bandani E, Eftekhary M, Jafari AA. Virulence genes profile of multidrug resistant pseudomonas aeruginosa isolated from Iranian children with UTIs. *Acta Med Iran*. 2016;**54**(3):201-10. PMID: 27107526
30. Valadbeigi H, Sadeghifard N, Rafiei Tabatabaei R, Maleki A. A study on the frequency of toxin a, alginate genes, and of clinical pseudomonas aeroginosa strains. *J Ilam Univ Med Sci*. 2012;**20**(1):58-64. [Persian]
31. Hwang S, Kim CY, Ji SG, Go J, Kim H, Yang S, et al. Network-assisted investigation of virulence and antibiotic-resistance systems in Pseudomonas aeruginosa. *Sci Rep*. 2016;**6**:26223. PMID: 27194047 DOI: 10.1038/srep26223
32. Ertugrul BM, Oryasin E, Lipsky BA, Willke A, Bozdogan B. Virulence genes fliC, toxA and phzS are common among Pseudomonas aeruginosa isolates from diabetic foot infections. *J Infect Dis*. 2018;**50**(4):273-9. PMID: 29078729 DOI: 10.1080/23744235.2017.1393839