

بررسی و شناسایی ژن‌های کروم سنسینگ در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از نمونه‌های بالینی انسانی به روش Multiplex PCR و تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی

فیروزه امینی بزنجان^۱، رزاق محمودی^{۲*}، کیومرث امینی^۳

۱- کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد سیرجان، دانشگاه آزاد اسلامی، سیرجان، ایران.

۲- دانشیار، گروه بهداشت و ایمنی مواد غذایی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران.

۳- استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران.

یافته / دوره هجدهم / شماره ۲ / تابستان ۹۵ / مسلسل ۶۸

چکیده

دریافت مقاله: ۹۵/۱۲/۱۱ پذیرش مقاله: ۹۵/۱۲/۱

*** مقدمه:** سودوموناس آئروژینوزا یک پاتوژن فرصت طلب و عامل ۱۰ الی ۱۵ درصد از عفونت‌های بیمارستانی می‌باشد. وجود ژن‌های حدت یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های تهاجمی سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد و این موضوع از نظر پزشکی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. بیان بسیاری از ژن‌های بیماری‌زای باکتری سودوموناس آئروژینوزا به وسیله یک سیستم ژنی به نام سیستم Quorum Sensing (QS) کنترل و تنظیم می‌گردند. کروم سنسینگ سیستم ارتباطی سلول به سلول با استفاده از مولکول‌های کوچک SMS در ارگانیزم‌های تک سلولی است. هدف از تحقیق بررسی شیوع ژن‌های دخیل در سیستم کروم سنسینگ در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از منابع انسانی می‌باشد.

*** مواد و روش‌ها:** در این مطالعه، ۶۰ نمونه سودوموناس آئروژینوزا از نمونه‌های گوارش انسانی تهیه و در محیط‌های اختصاصی کشت و توسط تست‌های تشخیصی و افتراقی تأیید گردیدند. آزمون Multiplex PCR برای ردیابی ژن‌های مورد نظر انجام گرفت. آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی علیه ۱۰ عامل ضد میکروبی صورت گرفت.

*** یافته‌ها:** نتایج Multiplex PCR نشان داد که میزان فراوانی ژن‌های *rhlR* ۵ درصد، ژن *lasR* ۴۸/۳ درصد و ژن *lasI* ۶۰ درصد بوده، در صورتی که ژن‌های *lasB* *apr* *rhlAB* و *rhlI* در هیچ یک از نمونه‌ها شناسایی نگردیدند. در آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی، بیشترین میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمیکاسین، آموکسی‌سیلین و سفوتاکسیم و بیشترین میزان حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و سفتازیدیم گزارش گردیده است.

*** بحث و نتیجه‌گیری:** ژن‌های سیستم QS فراوانی بالایی در بین سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از منابع انسانی دارند.

*** واژه‌های کلیدی:** سودوموناس آئروژینوزا، کروم سنسینگ.

*آدرس مکاتبه: قزوین، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، دانشکده بهداشت، گروه بهداشت و ایمنی و مواد غذایی.

پست الکترونیک: r.mahmodi@yahoo.com

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا باکتری گرم منفی هوازی است که معمولاً در محیط یافت می شود و توانایی متابولیکی متنوعی دارد (۱). این باکتری پاتوژن فرصت طلبی است که اغلب منجر به عفونت های بیمارستانی خطرناکی در افراد با سیستم ایمنی ضعیف شده می شود (۲). مهم ترین عوامل حدت سودوموناس آئروژینوزا عبارتند از: پیوسیانین، همولیزین، الاستاز، تشکیل بیوفیلم که به گسترش بافتی و مقاومت آن در برابر آنتی بیوتیک ها کمک می کند و ریشه کنی عفونت در اثر ابتلا به این باکتری بسیار دشوار می باشد (۳-۵). تشکیل بسیاری از عوامل حدت این باکتری از طریق یک سیستم وابسته به سلول به نام Quorum Sensing بیان می شود. کروم سنسینگ سیستم ارتباطی سلول به سلول با استفاده از مولکول های کوچک SMS در ارگانیسم های تک سلولی است که از طریق ترشح مولکول های ارتباطی به داخل محیط و سپس اتصال آن ها به پروتئین های گیرنده عمل می کند و بنابراین به طور مستقیم یا غیرمستقیم رونویسی و ترجمه را تحت تأثیر قرار داده و اطلاعات را مبادله می کنند. در باکتری سودوموناس آئروژینوزا سیستم QS از ۲ سیستم ژنی *lasR-lasI* و *rhlR-rhlI* تشکیل شده است، ژن های *lasI* و *rhlI* بیان کننده دو آنزیم acyl-hemoserine lactone (acyl-HSL) سنتتاز می باشند، در حالی که ژن های *lasR* و *rhlR* تولیدکننده پروتئین های تنظیم کننده رونویسی می باشند که با اتصال به سیگنال اختصاصی خود سبب فعال سازی ژن های بیماری زا می شوند. به علاوه بیان *rhl* خود در هر دو مرحله رونویسی و بعد از رونویسی توسط سیستم *las* کنترل می شود (۲،۳). علاوه بر ژن های فوق الذکر، ژن های دیگری در باکتری سودوموناس آئروژینوزا توسط کروم سنسینگ کنترل و بیان می شوند و در بیماری زائی این باکتری نقش دارند که می توان به ژن های *apr-lasB* و *rhlAB* اشاره کرد. کروم سنسینگ تولید بسیاری از عوامل ویروانس خارج سلولی مانند تشکیل

بیوفیلم و پمپ ایفلاکس را تنظیم می کند به طوری که موتان های این ژن فاقد قدرت تشکیل بیوفیلم نرمال هستند و دارای حدت کمتری نسبت به سویه وحشی می باشند. این امر نشان دهنده نقش کلیدی کروم سنسینگ در بیماری زایی سودوموناس آئروژینوزا می باشد. به علاوه ژن های *las* و *rhl* تولید بسیاری از عوامل حدت مانند پروتئازها (*lasA/lasB*)، الاستاز، آکالین پروتئاز، آگزوتوکسین A، رامنولیبیدها، پیوسیانین، لکتین و سوپراکسید دیسموتاز را تنظیم می کنند (۳،۶). علاوه بر تنظیم بیان ژن های حدت، سیستم ایمنی میزبان را نیز تحت تأثیر قرار می دهد به طوری که از پرولیفراسیون لنفوسیت ها جلوگیری کرده، تولید TNF- و IL-12 را کاهش می دهد و باعث القای آپوپتوز در ماکروفاژها و نوتروفیل ها می شود (۳). ژن های سیستم QS در باکتری سودوموناس آئروژینوزا علاوه بر دخالت در بیماری زایی، یک ژن اختصاصی گونه بوده که می توان با طراحی پرایمر اختصاصی ژن های آن، با حساسیت و اختصاصیت بسیار بالای سودوموناس آئروژینوزا بیماریزا را به روش مولکولی و سریع با استفاده از روش PCR شناسایی نمود (۲). در روش Multiplex PCR به دلیل استفاده از چند آغاز گر توانایی ازدیاد و شناسایی چندین ژن همزمان با هم وجود دارد. هدف از این مطالعه بررسی میزان شیوع ژن های *lasR-lasI*، *rhlR-rhlI*، *apr-lasB* و *rhlAB* در سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از منابع انسانی به روش Multiplex PCR و آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی این جدایه ها می باشد.

مواد و روش ها

جداسازی و شناسایی باکتری

در این مطالعه مقطعی - توصیفی، بر اساس مطالعات قبلی و سطح اطمینان ۹۵٪ با استفاده از فرمول $n = z^2 P(1-P) / d^2$ و خطای قابل قبول ۰/۰۵، ۱۰۰ نمونه انسانی از ترشحات گوارشی بیماران در مراکز درمانی سطح شهر تهران جمع آوری و به آزمایشگاه میکروب شناسی

آزمایش حساسیت به آنتی بیوتیک های سفپیم، نیتروفورانتوئین، سفتریاکسون، سفیکسیم، نالیدیکسیک اسید، اریترومایسین، آمیکاسین، جنتامایسین، سیپروفلوکساسین و آمپی سیلین سنجیده شد.

جدول ۱. آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه

اندازه محصول (bp)	ژن هدف	ردیف پرایمر (5' به 3')
۱۵۳	<i>lasB-f</i> <i>lasB-r</i>	Ttctacccgaaggactgatac Aacacccatgatcgcaac
۱۴۰	<i>aprA-f</i> <i>aprA-r</i>	Accctgtcctattcgtcc Gattgcagcgacaacttgg
۱۵۱	<i>rhlAB-f</i> <i>rhlAB-r</i>	Tcatggaattgtcacaaccgc Atacggcaaatcatggcaaac
۲۹۵	<i>lasI-f</i> <i>lasI-r</i>	Cgtgctcaagtgttcaag Tacagtgcgaaaagcccag
۱۳۰	<i>lasR-f</i> <i>lasR-r</i>	Aagtggaaaattggagtggag Gtagtggccgacgatgaag
۱۵۵	<i>rhlI-f</i> <i>rhlI-r</i>	Ttcatcctcttttagttctcc Ttccagcattcagagagc
۱۳۳	<i>rhlR-f</i> <i>rhlR-r</i>	tgcattttatcgatcagggc cactcctttccaggacg

یافته ها

تمامی نمونه های مورد بررسی با استفاده از آزمایشات بیوشیمیایی به عنوان سودوموناس آئروژینوزا تأیید گردیدند. آزمون PCR بر روی ۶۰ سویه سودوموناس آئروژینوزا برای ژن های *lasI*, *lasR*, *rhlI*، *rhlR*، *apr* و *rhlAB* نشان داد بیشترین میزان فراوانی مربوط به ژن *lasI* (۶۰ درصد) و کمترین میزان فراوانی مربوط به ژن *rhlR* (۵ درصد) بوده است (نمودار ۱). همچنین در نتایج آنتی بیوگرام مشخص گردید که بیشترین میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های آمیکاسین، آموکسی سیلین و سفوتاکسیم به ترتیب ۱۰۰٪، ۱۰۰٪ و ۹۴/۶٪ بوده است. بیشترین میزان حساسیت در بین آنتی بیوتیک های سیپروفلوکساسین در ۵۳ نمونه ۸۸/۳٪ و سفتازیدیم ۴۲ نمونه ۷۰٪ مشاهده شد (جدول ۲).

انتقال داده شد. به منظور شناسایی باکتری از آزمون های بیوشیمیایی مانند تست های اکسیداز، کاتالاز، TSI، تست OF، آزمون سیمون سیترات، رشد در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد، تولید رنگدانه، بوی خاص و رنگ آمیزی گرم استفاده شد. در نهایت ۶۰ نمونه باکتری سودوموناس آئروژینوزا شناسایی گردید.

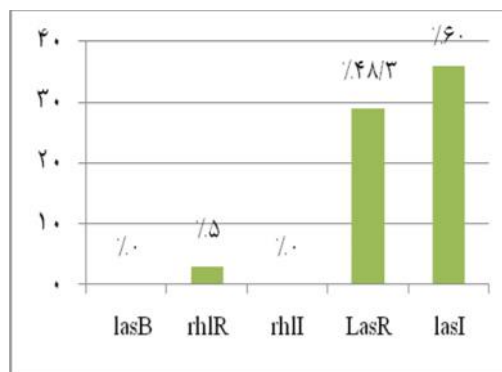
آزمون PCR

استخراج DNA با استفاده از کیت تجاری سیناژن مطابق دستورالعمل ارائه شده توسط کیت انجام شد. واکنش Multiplex PCR جهت شناسایی ژن های Quorum Sensing در باکتری سودوموناس آئروژینوزا انجام شد. آزمون PCR بر روی ۶۰ سویه سودوموناس آئروژینوزا برای ژن های *lasB*, *rhlR*, *rhlI*, *lasR*, *lasI* و *apr* انجام گرفت (جدول ۱) (۶). در این پژوهش واکنش زنجیرهای پلیمرز PCR استاندارد در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر PCR Master Mix، ۰/۶ میکرولیتر از هر پرایمر (با غلظت ۱۰ پیکومول)، ۸/۳ میکرولیتر آب مقطر و ۳ میکرولیتر از DNA الگو انجام گردید. برنامه حرارتی جهت انجام واکنش های PCR عبارت بود از واسرشت اولیه در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ سیکل هرکدام شامل: واسرشت در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، امتداد در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه و نیز امتداد نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه. محصولات PCR در ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز گردیدند. سپس به وسیله اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و توسط دستگاه ترانس لومیناتور مشاهده شدند.

آنتی بیوگرام

آنتی بیوگرام برای جدایه های سودوموناس آئروژینوزا از طریق روش دیسک دیفیوژن (Kirby-Bauer) بر اساس راهنمای استاندارد CSLI انجام شد (۷،۸). در این

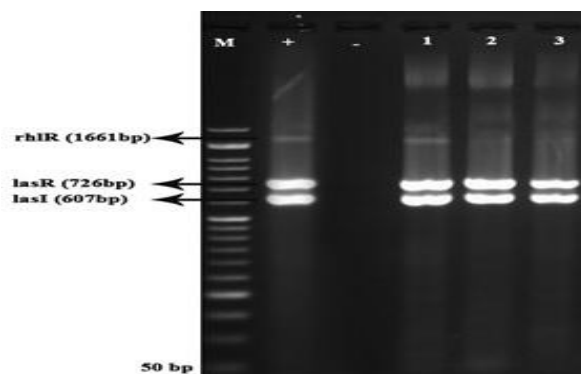
بررسی، میزان شیوع ژن های سیستم کروم سنسینگ در جدایه های سودوموناس آئروژینوزا بررسی گردید و ژن های *lasI* و *lasR* به ترتیب در ۶۰٪، ۴۸٪ و ۵٪ نمونه ها حضور داشتند. ولی ژن های *rhlR* و در هیچ یک از نمونه های مورد بررسی مشاهده نشد. علت عدم شناسایی برخی از ژنها در مطالعه حاضر می تواند به علت عدم بیان ژن در نمونه ها باشد که در باکتری سودوموناس آئروژینوزا اتفاق می افتد. آقا ملایی و همکاران در تحقیقی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *lasI* جهت تشخیص سریع باکتری سودوموناس آئروژینوزا استفاده کردند. در این تحقیق از ۴۰ نمونه بالینی جدا شده ۴۸/۵٪ دارای ژن *lasI* بودند (۲). در مطالعه ای بر روی ژن های *QS* ۸۱/۶ درصد از نمونه ها حاوی ژن های کروم سنسینگ بودند که در این میان ژن های *lasR*، *lasI* و *rhlR* به ترتیب ۵ درصد، ۷۸/۳ درصد، ۶۵ درصد و ۴۳/۳ درصد گزارش شدند (۶). به دلیل حضور این ژن های *QS* در بیماری های مرتبط با این باکتری و به دلیل نقش اصلی و مهم این ژنها، فراوانی در بیشتر مطالعات به میزان قابل توجهی بوده به طوری که اختلاف در میزان شیوع هر یک از این ژنها بسته به تعداد نمونه ها و یا نوع نمونه ها اختلاف کمی مشاهده می شود و این نوع ژن های حدت، دارای فراوان بالایی می باشند. در مطالعه حاضر نیز بیشترین فراوانی مربوط به ژن *lasI* با ۶۰ درصد و بهتر از اهمیت سیستم های کروم سنسینگ در سودوموناس آئروژینوزا در رشد عفونت قریه ای، مشخصات ژنوتیپی و بیماریزایی ایزوله های چشمی با فعالیت AHL و پروتئاز در *lasI* / *lasR* و *rhlR* مورد بررسی قرار داد و عنوان کردند ناکارآمدی کروم سنسینگ ممکن است به طور طبیعی در ایزوله های بالینی روی دهد و دسترسی به *lasI* و سیستم کاربردی *QS* ممکن است در رشد عفونت های قریه ای بسیار مؤثر باشد (۹). بوسگلمز (۲۰۰۸) در گزارش خود عنوان نمود که سویه های دچر موتاسیون در ژن های *QS* نمی توانند سیگنال های لازم مولکول C4-HSL را که ارتباط مستقیم با فاکتورهای حدت



نمودار ۱. توزیع فراوانی ژن های مورد مطالعه

جدول ۲. میزان حساسیت سویه های سودوموناس آئروژینوزا جداسازی شده به آنتی بیوتیک های مختلف با روش دیسک دیفیوژن بر حسب تعداد و درصد

نوع آنتی بیوتیک	میزان مقاومت تعداد (%)	حساسیت متوسط تعداد (%)	میزان حساسیت تعداد (%)
	Resistance	Intermediate	Sensitive
سفتواکسیم	۵۵ (۹۱/۶٪)	-	۵ (۸/۴٪)
سفتازیدیم	۱۸ (۳۰٪)	-	۴۲ (۷۰٪)
آموکسی سیلین	۶۰ (۱۰۰٪)	-	-
سیپروفلوکساسین	۷ (۱۱/۷٪)	-	۵۳ (۸۸/۳٪)
آمیکاسین	۶۰ (۱۰۰٪)	-	-
جنتامایسین	۳۵ (۵۸/۳٪)	-	۲۵ (۴۱/۷٪)



شکل ۱. نتایج واکنش PCR جهت شناسایی ژن های کروم سنسینگ، M: مارکر ۵۰ bp، +: کنترل مثبت، -: کنترل منفی، ۱ تا ۳ نمونه های سودوموناس آئروژینوزا، دارای ژن های *lasI*، *LasR* و *rhlR* با طول باند ۶۰۷ bp، ۷۲۶ bp و ۱۶۶۱ bp.

بحث و نتیجه گیری

بسیاری از فاکتورهای بیماریزای باکتری سودوموناس آئروژینوزا به وسیله یک سیستم ژنی به نام سیستم Quorum Sensing (QS) کنترل و تنظیم می گردند (۶). در این

دارد تولید کند هرچند این موتاسیون منجر به ایجاد عفونت در بیماران می گردد (۱۰). در این مطالعه میزان مقاومت سویه های جمع آوری شده نسبت به دسته های مختلف آنتی بیوتیکی تعیین شد. بیشترین میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های آمیکاسین، آموکسی سیلین و سفوتاکسیم به ترتیب ۱۰۰٪، ۱۰۰٪ و ۹۴/۶٪ مشاهده شد. مقاومت به سایر آنتی بیوتیک ها هم مشاهده گردید بدین ترتیب که ۵۸/۳٪ به جنتامایسین، ۱۸٪ به سفتازیدیم و ۱۱/۷٪ به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند. در مطالعه آذرگون و همکاران از ۵۱ نمونه سودوموناس آئروژینوزا جداسازی شده از بیماران مبتلا به سیستمیک فیبروزیس، ۳۷/۲٪ مقاوم به جنتامایسین، ۲۱/۵٪ مقاوم به آمیکاسین، ۱۵/۷٪ مقاوم به سیپروفلوکساسین و ۹/۸٪ مقاوم به سفتازیدیم بودند (۱۱). در بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های بالینی سودوموناس آئروژینوزا ایزوله شده از مراکز درمانی شهر اراک میزان مقاومت سفتازیدیم (۳۳/۳٪)، آمیکاسین (۲۰/۳٪)، سیپروفلوکساسین (۱۵/۷٪) جنتامایسین (۱۹/۴٪) به دست آمد (۱۲). در مطالعه حاضر میزان مقاومت در برابر آمیکاسین ۱۰۰٪ بود که در مقایسه با سایر مطالعات به عمل آمده با سایر مطالعات مقاومت بیشتری را نشان داد (۱۱، ۱۲). از طرفی در مطالعات میرصالحیان و همکاران (۱۳) و رستم پور و همکاران (۱۴) میزان مقاومت به این آنتی بیوتیک بسیار بالا بوده است. به نظر می رسد این تفاوت می تواند به دلیل تفاوت در منبع سویه ها باشد. میزان مقاومت سودوموناس آئروژینوزا به آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین در مطالعات فاضلی و همکاران (۱۵)، رضایی و همکاران (۱۶)، شاهچراغی و همکاران (۱۷) و دوستی و

همکاران (۱۸) به ترتیب ۹۸/۷٪، ۴۲٪، ۴۱٪ و ۴۰/۶٪ بود. مقایسه نتایج این تحقیق (۱۱/۷٪ مقاومت) با تحقیق های دیگر نشان داد که مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه های سودوموناس آئروژینوزا نسبت به سایر آنتی بیوتیک ها کمتر بوده و هنوز کارآیی لازم را جهت درمان بیماران مبتلا به این باکتری دارا می باشد. سفتازیدیم آنتی بیوتیک دیگری است که در مطالعه حاضر مورد بررسی قرار گرفت و میزان مقاومت ۳۰٪ از خود نشان داد. مقایسه این نتیجه با نتایج سایر مطالعات از جمله فاضلی و همکاران (۱۰۰٪) (۱۵)، شاهچراغی و همکاران (۴۲٪) (۱۷)، دوستی و همکاران (۷۸/۹٪) (۱۸)، میهنی و همکاران (۸۱٪) (۱۹)، موحدی و همکاران (۷۵٪) (۲۰)، صادری و همکاران (۷۳/۴۴٪) (۲۱)، نشان می دهد نمونه های سودوموناس آئروژینوزا در این تحقیق کمترین میزان مقاومت به سفتازیدیم را نسبت به سایر مطالعات دارند. می توان نتیجه گرفت که ژن های سیستم QS دارای فراوانی بالایی در بین سویه های سودوموناس آئروژینوزا دارد. با توجه به اینکه این سیستم نقش مهمی در پاتوژنیسیته سودوموناس آئروژینوزا دارد (۲۲)، نتایج این تحقیق می تواند راهگشای درمان در مورد این بیماری باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد بوده که در آزمایشگاه میکروبیولوژی پاسارگاد انجام گرفته است و نویسندگان مقاله بر خود لازم می دانند که از همکاران و پرسنل آزمایشگاه مهندس ابوالفضل مقدم و دکتر علیرضا مختاری تقدیر و تشکر نمایند.

References

1. Angosto D, Lopez-Castejon G, Lopez-Munoz A, Sepulcre MP, Arizcun M, Meseguer J, Mulero V. Evolution of inflammasome functions in vertebrates: Inflammasome and caspase-1 trigger fish macrophage cell death but are dispensable for the processing of IL-1 . *Innate immunity*. 2012 ;1;18(6):815-24.
2. Aghamollaei H, Azizi Barjini K, Moosazadeh Mogaddam M. Rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa* by PCR method using specific primers of quorum sensing *lasI* gene. *Armaghane-danesh (YUMSJ)*. 2014; 18(9): 722-735. (In Persian)
3. Antunes LC, Ferreira RB, Buckner MM, Finlay BB. Quorum sensing in bacterial virulence. *Microbiol*. 2010; 156(8): 2271-2282.
4. Castillo-Juárez I, Maeda T, Mandujano-Tinoco EA, Tomás M, Pérez-Eretza B, García-Contreras SJ, et al. Role of quorum sensing in bacterial infections. *World J Clin Cases:WJCC*.2015;16;3(7):575.
5. Hilker R, Munder A, Klockgether J, Losada PM, Chouvarine P, Cramer N, et al. Interclonal gradient of virulence in the *Pseudomonas aeruginosa* pangenome from disease and environment. *Environ Microbiol*. 2015 Jan 1;17(1):29-46.
6. Kadhim D and Ali MR. Prevalence study of quorum sensing groups among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Curr Microbiol App Sci*. 2014; 3(11): 204-215.
7. Benbelaid F, Khadir A, Bendahou M, Zenati F, Bellahsene C, Muselli A, et al. Antimicrobial activity of *Rosmarinus eriocalyx* essential oil and polyphenols: An endemic medicinal plant from Algeria. *Coastal Life Medicine (JCLM)*. 2016; 4(1): 39-44.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial susceptibility Testing; twenty first Informational Supplement*. M100-S21. 2011: Wayne, PA: CLSI.
9. Zhu H, Conibear TCR, Bandara R, Aliwarga R, Stapleton F. Type III secretion system – associated toxins, proteases, serotypes, and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolate associated with keratitis. *Curr Eye Res*. 2006; 31: 297-306.
10. Bosgelmez GT, Ulusoy S. Characterization of N-butanoyl-l-homoserine lactone (C4-HSL) deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Pathog*. 2008; 44: 13-19.
11. Azargoon R, doustdar F, khanbabaei G, mehrnejad F, goudarzi H. Type III secretion system characterization of *Pseudomonas aeruginosa* associated with cystic fibrosis. *Res Med*. 2013; 37(3): 189-193.
12. Taghvae R, Shojapour M, Sadeghi A, Pourbabay AA. The Study of Antibiotic Resistance Pattern and the Frequency of Extended-SpectrumBeta-Lactamases (ESBL) in *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Medical Centers in Arak City, Iran. *Qom Univ Med Sci J*. 2013; 7(4): 36-41. (In Persian)
13. Mirsalehian A, Akbari Nakhjavani F, Bahador A, Jabal Ameli F, Bigverdi R, Goli H. Prevalence of MBL-producing

- Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. Tehran University Medical Journal. 2011; 68(10): 563-569. (In Persian)
14. RostamPour S, Gorzin AA, Motamedi Gh. Frequency of blaKHM-1, blaIMP-1,2 and blaSPM-1 genes in clinical isolates of metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in hospitalized burned patients in Ghotbeddin Shirazi Hospital. J Qom Uni Med Sci. 2015; 19(2): 21- 29. (In Persian)
 15. Fazeli H, Moslehi Z, Irajian G, , Shokri D, Salehi M. Determination of drug resistance patterns and detection of bla-VIM gene in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burned patients in Emam Mosa Kazem hospital, Isfahan, Iran (2008-9). Iranian J Med Microbiol. 2010; 3(4): 1-8. (In Persian)
 16. Rezaei Yazdi H, Behzadian NG, Peerayesh SN, Mostafaei M. Prevalence and detection of metallo- β -lactamase (MBL) producing *Pseudomonas aeruginosa* strains from clinical isolates in Iran. Ann Microbiol. 2007; 57: 293-296.
 17. Shahcheraghi F, Nikbin VS, Feizabadi MM. Prevalence of ESBLs Gene among Multidrug-Resistant Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Patients in Tehran. Microb Drug Resist. 2009; 15(1): 37 -39.
 18. Doosti M, Ramazani A, Garshasbi M. Identification and characterization of metallo-beta-lactamases producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in University Hospital from Zanjan Province, Iran. Iran Biomed J. 2013; 17(3): 129-133. (In Persian)
 19. Mihani F, Khosravi A. MBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with burn wound infections and PCR methods to identify blaVIM , blaIMP genes. Iran J Microbiol. 2007; 1(1): 23-31. (In Persian)
 20. Movahedi Z, Pourakbari B, Mahmoudi S, Sabouri F, Ashtiani Haghi MT, Hosseinpour Sadeghi R, et al. *Pseudomonas aeruginosa* infection among cystic fibrosis and ICU patients in the referral children medical hospital in Tehran, Iran. J Prev med Hyg. 2013; 54(1): 24-28. (In Persian)
 21. Sadari H, Karimi Z, Owlia P, Bahar MA, Akhavan Rad SMB. Phenotypic detection of metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in strains isolated from burned patients. Iranian J pathol. 2008; 3(1): 20-24. (In Persian)
 22. Jena J, Debata NK, Sahoo RK, Subudhi E. Phylogenetic study of metallo- β -lactamase producing multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from burn patients. Burns. 2015;31;41(8):1758-1763.