Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services
Vol. 38, No. 6, Feb. – Mar. 2017, Pages: 74-83

Original Article

Genotyping and Antibiotic Susceptibility Patterns of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Burn Ward of Sina Hospital in Tabriz

Mohammad Reza Nahaei[1]*, Mehryar Nahaei[2], Javid Sadeghi [1], Najieh Beygoli[3]

[1]Drug Applied Research Center, Department of Microbiology, School of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[2]Department of General Surgery, Imam Khomeini Hospital, Urima University of Medical Sciences, Urmia, Iran
[3]Microbiology Laboratory, Sina Hospital, Tabriz, Iran

Received: 4 Jan, 2015 Accepted: 4 Feb, 2015

Abstract

Background & Objectives: *Pseudomonas aeruginosa* is one of the important nosocomial Gram-negative bacilli which are resistant to most of antimicrobial agents and antibiotics. This opportunistic bacterium is capable of causing life threatening infections in patients, especially in those with immunodeficiency such as those in ICUs and burn wards. This study was conducted to detect antibiotic susceptibility and also molecular typing of *P. aeruginosa* isolates from burn infections by using RAPD (Random amplified polymorphic DNA).

Materials & Methods: Totally 124 *P. aeruginosa* isolates collected from burn patients consisting of burn infection discharge and blood specimens by application of conventional microscopic, culture and biochemical identification tests. The collected isolates were studied for their antibiotic susceptibility patterns using routine antibiotics ceftazidim (30 µg), aztreonam (30 µg), carbenicillin (100 µg), polymixin B(300 u), colistin(100 µg), gentamicin(10 µg) and ciprofloxacin(5 µg) by disc agar diffusion method and detection of genotypes by two short primers namely 272(5'-AGCGGCCAA-3') and 208(5'-ACGGCCGACC-3') according to RAPD-PCR method.

Results: Results of antibiotic susceptibility tests showed high resistance to aztreonam (70.1%), ceftazidime (66.1%), colistin (61.2%) and gentamicin (47.5%), but less resistance to ciprofloxacin(18.5%) and polymixin B(13.7%). Based on antibiotic susceptibility 41 patterns were detected.
RAPD-PCR created 32 genotypic profiles with base pair length ranging from 250 to 10000. Each genotype showed between 1 and 8 different weight DNA bands. Genotype 3 was the most prevalent, identified in 42 isolates (33.8%) and accommodated isolates with similar antibiotic susceptibility patterns, while in other genotypes no similar susceptibility patterns were encountered.

Conclusion: Our *P. aeruginosa* isolates collected from burn infections were most resistant to aztreonam (70.1%), but least resistant to polymixin B (13.7%). The test isolates showed 41 antibiotic susceptibility patterns and 32 RAPD genotypes. Genotype 3 was the most prevalent and accommodated isolates with similar antibiotic susceptibility patterns, but in other genotypes, isolates with similar antibiotic susceptibility patterns was not detected. Some isolates with similar antibiotic patterns underline possibility of their transfer among burn patients and suggest need for restricted conditions and microbiologic surveillance in the burn wards.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Antibiotic susceptibility pattern, RAPD-PCR, Genotyping, Burn patient

*Corresponding author:
E-mail: nahaeimr@tbzmed.ac.ir

Citation: Nahaei M R, Nahaei M, Sadeghi J, Beygoli N. Genotyping and Antibiotic Susceptibility Patterns of Pseudomonas aeruginosa Isolated from Burn Ward of Sina Hospital in Tabriz. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2017;38(6):74-83.

مقاله پژوهشی

ژنوتایپینگ و بررسی حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله های بیمارستانی سودوموناس ائروجینوزا در بخش سوانح سوختگی مرکز آموزشی و درمانی سینای تبریز

محمدرضا نهائی*[۱]، مهریار نهائی[۲]، جاوید صادقی[۱]، ناجیه بیگلی[۳]

[۱]مرکز تحقیقات کاربردی دارویی و گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
[۲]گروه جراحی عمومی، بیمارستان امام خمینی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران
[۱]مرکز تحقیقات کاربردی دارویی و گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
[۳]آزمایشگاه میکروب شناسی، مرکز آموزشی و درمانی سینای تبریز

دریافت: ۹۳/۱۰/۱۴ **پذیرش:** ۹۳/۱۱/۱۵

چکیده

زمینه و اهداف: سودوموناس ائروجینوزا یکی از باکتری‌های مهم در عفونت‌های بیمارستانی است که قادر به ایجاد مقاومت‌های دارویی در مقابل بسیاری از عوامل ضدمیکروبی و آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد. این باکتری فرصت طلب در بیماران مختلف بویژه در بیماران مبتلا به نقص ایمنی از قبیل بیماران بستری در بخش‌های مراقبت ویژه و بخش‌های سوختگی قادر به ایجاد عفونت‌های خطرناک و منجر به مرگ می‌گردد. این باکتری اغلب از منشاء محیط بیمارستان انتقال یافته و با داشتن مقاومت آنتی بیوتیکی وسیع چرخه‌ی عفونت‌های بیمارستانی را دوام می‌بخشد. این مطالعه جهت شناخت بهتر اپیدمیولوژیک سویه‌های دخیل در عفونت‌های سوختگی در بخش سوانح سوختگی مرکز آموزشی و درمانی سینای تبریز و مقایسه‌ی ژنومی باکتری‌های جدا شده از عفونت-های سوختگی با استفاده از روش RAPD (Random amplified polymorphic DNA) انجام شد.

مواد و روش‌ها: تعداد ۱۲۴ ایزوله‌ی سودوموناس ائروجینوزا از نمونه‌های مختلف بیماران بستری در بخش سوختگی شامل ترشحات زخم سوختگی و خون، با روش‌های مرسوم آزمایشگاهی شامل میکروسکوپی، کشت و انجام تست‌های بیوشیمیایی جداسازی شدند. ایزوله‌های جمع‌آوری شده جهت (۱) شناسایی الگوی حساسیت و مقاومت در برابر آنتی بیوتیک‌های رایج در درمان شامل سفتازیدیم، آزترونام، کاربنی سیلین، پلی میکسین B، کولیستین، جنتامایسین و سیپروفلوکساسین با استفاده از روش دیسک آگار دیفیوژن و (۲) DNA ایزوله‌ها استخراج شده و از روش RAPD-PCR با استفاده از دو پرایمر کوتاه ۲۷۲(5'-AGCGGCCAA-3') و ۲۰۸(5'-ACGGCCGACC-3') مورد مقایسه قرار گرفتند.

یافته‌ها: حساسیت و مقاومت به آنتی بیوتیک‌های آزمایشی، نشانگر مقاومت بالا در برابر آزترونام (۷۰/۱٪)، سفتازیدیم (۶۶/۱٪)، کولیستین (۶۱/۲٪)، کاربنی‌سیلین (۵۱/۶٪)، جنتامایسین (۴۷/۵٪)، سیپروفلوکساسین (۱۸/۵٪) و پلی میکسین B (۱۳/۷٪) بود. ایزوله های آزمایشی ۴۱ الگوی حساسیت آنتی-بیوتیکی نشان دادند. نتایج RAPD نشانگر وجود ۳۲ ژنوتیپ مختلف در بین ایزوله‌های آزمایشی بود که از این تعداد ۶۰ ایزوله دارای ژنوتیپ مشابه (۴۲ ایزوله با یک باند مشابه، ۲ ایزوله با دو باند مشابه، ۸ ایزوله با سه باند مشابه، ۶ ایزوله با چهار باند مشابه و ۲ ایزوله با هشت باند مشابه) بودند. اگرچه مقایسه‌ی ژنوتیپ RAPD با الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی در یکی از ژنوتیپ‌ها تشابهات الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی را نشان داد، ولی در بقیه‌ی ژنوتیپ‌ها چنین تشابهی مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه ۱۲۴ ایزوله‌ی سودوموناس ائروجینوزای ایزوله شده از عفونت‌های سوختگی بیشترین مقاومت را به آزترونام (۷۰/۱٪) و کمترین میزان مقاومت را به پلی‌میکسین B (۱۳/۷٪) نشان دادند. ایزوله‌های آزمایشی دارای ۴۱ الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی متفاوت بودند.نتایج RAPD-PCR نشانگر وجود ۳۲ ژنوتیپ مختلف در باکتری‌های آزمایشی بود. مقایسه‌ی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها بر اساس ژنوتیپ RAPD باکتریها فقط در ژنوتیپ ۳ که شامل ۴۲ ایزوله (۳۳/۸٪) بود تشابه الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی را نشان داد، درحالیکه در بقیه‌ی ژنوتیپ‌ها هیچگونه تشابهی بدست نیامد. لذا این تشابهات احتمال در گردش بودن این سویه‌ها در بین بیماران بخش سوختگی را مطرح می‌سازد و نیاز به اعمال شرایط دقیق ضد عفونی و پایش‌های میکروبیولوژیک لازم در این بخش‌ها را یادآور می‌شود.

کلید واژه‌ها: سودوموناس ائروجینوزا، الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی، RAPD-PCR، ژنوتیپ، بیمار دچار سوختگی.

* ایمیل نویسنده رابط: nahaeimr@tbzmed.ac.ir

مقدمه

سودوموناس ائروجینوزا شایعترین و مهمترین گونه در جنس سودوموناس می‌باشد که در عفونت‌های انسانی شرکت نموده و نقش مهمی را در عفونت‌های بیمارستانی، بویژه در بخش‌های سوانح سوختگی ایفا می‌کند. زخم سوختگی محیط مناسبی را برای کلونیزاسیون عوامل فرصت طلب بوجود می‌آورد و با توجه به شرایط ویژه این باکتری بعنوان عمده‌ترین عامل اتیولوژیک این عفونت‌ها محسوب می‌شود (۱و۲). بیماران بستری می‌توانند بعنوان مهمترین مخزن این باکتری باشند، زیرا ارگانیسم‌های موجود در محیط بیمارستان بوسیله انتقال از شخص به شخص و بقا ساپروفیتیک و رشد در شرایط مختلف بیمارستان چرخه عفونت را دوام می‌بخشند (۳). سویه‌های عامل عفونت‌های بیمارستانی برخلاف سویه‌های موجود در جامعه میزان بالایی از مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها را نشان می‌دهند (۴). مقاومت این سویه‌ها در مقابل انواع عوامل ضد میکروبی وآنتی‌بیوتیک‌ها و قابلیت ایجاد مقاومت در برابر داروهای جدید بخشی از مشخصات ذاتی این باکتری برای بومی شدن و ایجاد اپیدمی‌های بیمارستانی را تشکیل می‌دهد (۵) و از سوی دیگر نقص ایمنی در میزبان و میزان بالای مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها درمان عفونت ناشی از این باکتری را به یک چالش بزرگ تبدیل می‌سازد. درک چگونگی پخش باکتری بیماریزا نقش مهمی در کنترل عفونت‌های بیمارستانی و کمک به طراحی راههای کنترل عامل بیماریزا دارد (۱). معمولا روش‌های استاندارد شناسایی آزمایشگاهی گونه‌های سودوموناس متکی بر بررسی مورفولوژیک کلنی‌ها، پیوسین تایپینگ و تست‌های بیوشیمیایی نظیر سیستم API می‌باشد (۶)، ولی تنوع در طبیعت فنوتیپی سودوموناس ائروجینوزا بویژه در محیط‌های بیمارستانی موجب شده است که برای تیپ بندی این باکتری‌ها نتوان از روش‌های سروتایپینگ، پیوسین تایپینگ، بیوتایپینگ و تست حساسیت آنتی‌بیونیکی (آنتی بیوگرام) با قدرت تفکیک بالا استفاده نمود (۳و۷). اخیرا متدهای تایپینگ مولکولی سویه‌های مختلف این باکتری ابزار خوبی برای تعیین ارتباط کلونال بین باکتری‌های ایزوله شده از افراد مختلف یا منابع متفاوت می‌باشد (۱و ۵). این روش‌ها شامل RFLP (Restriction fragment length polymorphism)، انگشت نگاری ژنومیک با استفاده از PFGE (Pulse-field gel electrophoresis)، روش AP-PCR (Arbitrarily primed polymerase chain reaction) و RAPD (Random amplified polymorphic DNA) با موفقیت مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در این میان روش RAPD-PCR بعنوان روش مناسب برای سودوموناس ائروجینوزا توصیه شده و قابل مقایسه با PFGE معرفی گشته است (۸). لذا این روش در میان روش‌های ردیابی سویه‌های سودوموناس ائروجینوزای دخیل در عفونت‌های بیمارستانی، با داشتن قدرت تمایز خوب ابزار مناسبی برای ردیابی و تشخیص سویه‌های اپیدمیک در مقیاس محدود ازجمله در محیط بیمارستان محسوب می‌شود (۱، ۵ و ۹). در کشور ما نیز عفونت‌های بیمارستانی ناشی از سودوموناس ائروجینوزا بویژه در بخش‌های سوختگی از اهمیت عمده‌ای برخوردارند و انتظار می‌رود شناخت چگونگی سویه‌های بومی این باکتری در محیط بیمارستان، منجر به شناخت بهتر و اتخاذ پروتکل درمانی مناسب شده و در نهایت در کاهش عفونت‌های بیمارستانی مفید واقع شود. لذا این مطالعه جهت شناخت بهتر اپیدمیولوژیک سویه‌های بیمارستانی سودوموناس ائروجینوزای ایزوله شده از بخش سوانح سوختگی مرکز آموزشی و درمانی سینای تبریز انجام شد.

مواد و روش‌ها

تعداد ۱۲۴ ایزوله‌ی سودوموناس ائروجینوزا از بخش‌های سوختگی در بیماران بستری شده در مرکز آموزشی و درمانی سینای تبریز در طول ۱۱ ماه جمع‌آوری شد. ایزوله‌های فوق از کشت ترشحات زخم سوختگی یا از کشت خون بیماران جدا سازی شد. برای این منظور نمونه‌های بدست آمده از بیماران روی محیط کشت انتخابی ستریمید آگار تلقیح شده و به مدت ۴۸ ساعت در ۳۷ ^{o}C انکوبه شد. کلنی‌های سودوموناس ائروجینوزا در روی این محیط کشت حاشیه رنگی بدلیل رسوب پیگمان‌هایی از قبیل پیوسیانین و پیووردین داشتند. از سایر تست‌های تاییدی جهت تعیین هویت سودوموناس ائروجینوزا از قبیل تست اکسیداز، تولید اسید از گلوکز در محیط O/F، رشد در ۴۲oC استفاده شد. به منظور بدست آوردن الگوی حساسیت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها تست تعیین حساسیت بروش انتشار دیسک در آگار انجام پذیرفت. برای این منظور ۳ تا ۴ کلنی از کشت خالص باکتری ایزوله شده در محیط کشت تریپتی کیس سوی براث (Merck) حل شده و به مدت ۲ تا ۵ ساعت لوله‌ها در دمای ۳۷oC انکوبه شدند. این لوله با کدورت ۰/۵ استاندارد مک فارلند مقایسه شد. سپس سطح پلیت محیط کشت مولر هینتون آگار (Merck) با سواپ کشت شده و مدت ۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد تا سطح پلیت خشک شود. سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیک تهیه شده از شرکت Hi Media شامل سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)، آزترونام (۳۰ میکروگرم)، کاربنی‌سیلین (۱۰۰ میکروگرم)، پلی میکسین B (۳۰۰ واحد)، کولیستین (۱۰۰ میکروگرم)، جنتامیسین (۱۰ میکروگرم) و سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم) به کمک پنس در سطح آگار قرار داده شدند. پلیت‌ها به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در انکوباتور ۳۷oC قرار داده شدند. سپس قطر ناحیه مهار رشد باکتری اندازه‌گیری شد و بر اساس جدول استاندارد CLSI واکنش ایزوله‌ها در مقابل هر آنتی‌بیوتیک طبقه‌بندی شد (۱۰).

برای استخراج و خالص سازی DNA توتال، ایزوله ها را در محیط کشت LB کشت داده و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون باکتریها را سانتریفوژ کرده و رسوب تهیه شد. رسوب در ۳۵۰ میکرولیتر بافر TE محتوی ۱۰ mM تریس (pH 8.0) و ۱ mM EDTA حل گردید. سپس ۶۰ میکرولیتر از SDS ۱۰٪ اضافه شد، ۵ میکرولیتر نیز پروتئیناز K (۲۰ mg/ml) اضافه کرده و ورتکس کرده و به مدت ۲۰ دقیقه در ۶۵ oC انکوبه گردید. در مرحله بعد ۸۰ میکرولیتر از محلول CTAB/NaCl (۰/۷ M NaCl و CTAB ۱۰٪) گرم شده در ۶۵ ^{o}C اضافه شده و ورتکس گردید و به مدت

۲۰ دقیقه در ۶۵ °C انکوبه گردید. سپس ۷۰۰ میکرولیتر کلروفرم/ایزوآمیل الکل (۲۴:۱) اضافه شده و ۲۰ ثانیه ورتکس گردید و ۸ دقیقه در ۱۲۰۰۰ g سانتریفوژ شد. مایع رویی را به میکروتیوب ۱/۵ ml استریل دیگری منتقل کرده و ۴۲۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه نموده و به آرامی مخلوط کرده و ۳۰ دقیقه در فریزر ۲۰ oC– قرار داده شد. پس از اتمام انکوباسیون به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ g سانتریفوژ شد. مایع رویی را دور ریخته و ml ۱ اتانول ۷۰٪ سرد شده در فریزر اضافه شد و به آرامی میکروتیوب سروته شد و دوباره در ۱۲۰۰۰ g سانتریفوژ گردید. مایع رویی خالی و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اطاق انکوبه گردید تا اتانول تبخیر شود. در مرحله آخر ۱۰۰ میکرولیتر از بافر TE محتوی mM EDTA ۱و mM Tris ۱۰ بر روی رسوب ریخته شده و رسوب در آن حل گردید.

برای انجام RAPD-PCR از دو پرایمر ۲۷۲ (۵'–AGCGGGCCAA-3') و ۲۰۸(۵'–ACGGCCGACC-3') استفاده شد (۱۱). مخلوط واکنش با غلظت نهائی ۰۸ mM از dNTP mix، X۱از بافر PCR، mM۴ از MgCl2، uM ۰/۴ از هر یک از پرایمرها، U۲ از Taq DNA polymerase و ng۴۰ از DNA الگو مورد استفاده قرار گرفت. واکنش PCR با ترمال سایکلر Eppendrof AG بصورت ۴ سیکل (۵ دقیقه در ۹۴°C، ۵ دقیقه در ۳۶°C و ۵ دقیقه در ۷۲°C)، سپس ۳۰ سیکل (۱ دقیقه در ۹۴°C، ۱ دقیقه در ۳۶°C، و۲ دقیقه در ۷۲°C)، نهایتا" ۱۰ دقیقه در ۷۲°C انجام شد. پس از انجام واکنش PCR، محصول آن با استفاده از بافر TBE در اگاروز ۱٪ الکتروفورز گردید. سپس با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شده و با استفاده از دستگاه Gel document (UVP) عکسبرداری شد. در این مطالعه از DNA ladderهای با مشخصات SM 0323 و SM 0311 و از سویه‌ی استاندارد Pseudomonas aeruginosa PAO1 بعنوان کنترل مثبت در آزمایش‌های PCR استفاده شد.

یافته‌ها

ایزوله‌های جمع‌آوری شده از نمونه‌های مختلف بیماران بستری در بخش سوختگی با روشهای مرسوم آزمایشگاهی تعیین هویت شدند. کلیه ایزوله‌ها در محیط کشت ستریماید آگار رشد کرده و در این محیط کشت و نیز در محیط کشت مولر هینتون آگار مولد پیگمان بودند که پیگمان تولید شده عمدتا برنگ سبز یا زرد مایل به سبز بود. کلیه ایزوله‌ها اکسید از مثبت، کاتالاز مثبت، رشد در ۴۲°C مثبت، حرکت مثبت و قادر به اکسیده کردن گلوکز در محیط کشت O/F بودند، در حالیکه کربوهیدرات فوق را تخمیر نمی‌کردند. میزان مقاومت ایزوله‌ها به آزترونام ۷۰/۱٪، سفتازیدیم ۶۶/۱٪، کولیستین ۶۱/۲٪، کاربنی سیلین ۵۱/۶٪، جنتامیسین ۴۷/۵٪، سیپروفلوکساسین ۱۸/۵٪ و پلی میکسین B ۱۳/۷٪ بود (جدول ۱).

جدول ۱: حساسیت و مقاومت ایزوله‌های سودوموناس ائروجینوزا در برابر آنتی-بیوتیک‌های آزمایشی

آنتی بیوتیک	حساس	مقاوم	درصد مقاومت
پلی میکسین B	۱۰۷	۱۷	۱۳/۷
سیپروفلوکساسین	۱۰۱	۲۳	۱۸/۵۴
جنتامیسین	۶۵	۵۹	۴۷/۵۸
کاربنی سیلین	۶۰	۶۴	۵۱/۶۱
کولیستین	۴۸	۷۶	۶۱/۲۹
سفتازیدیم	۴۲	۸۲	۶۶/۱۲
آ زترونام	۳۷	۸۷	۷۰/۱۶

ایزوله‌های آزمایشی ۴۱ الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی نشان دادند. بیشترین تعداد ایزوله‌ها (۱۴ ایزوله) در گروه یک، سپس ۱۹ گروه دارای ۲ تا ۱۰ ایزوله بودند و بالاخره ۲۱ ایزوله (۱۶/۹٪) در گروه‌های مجزا و محتوی تک ایزوله قرار گرفتند (جدول ۲).

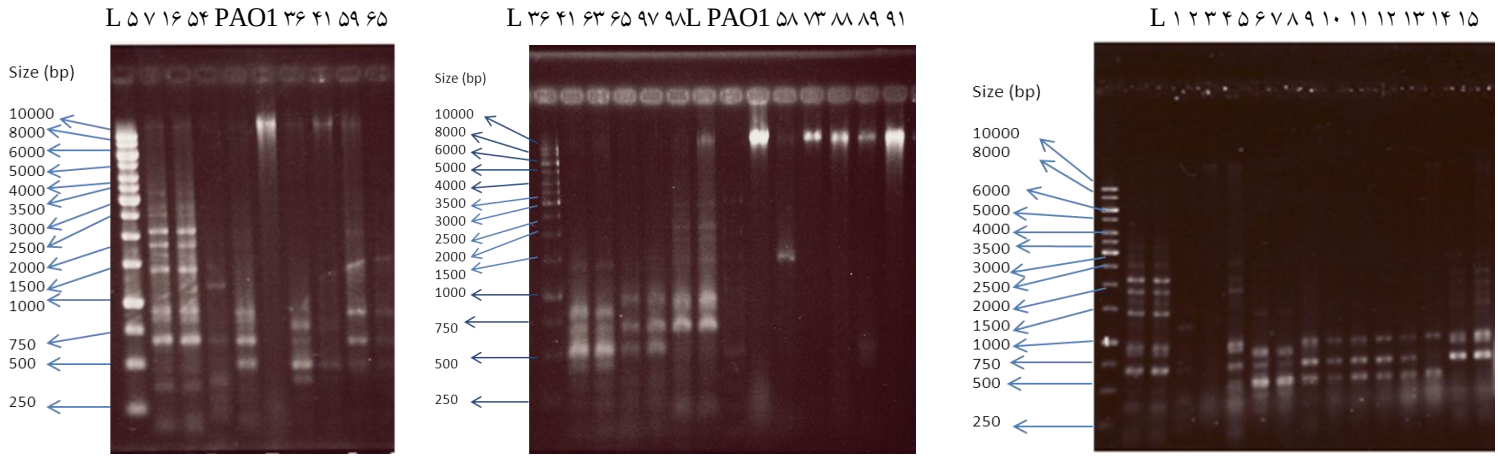
جدول ۲: الگوی حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها در ایزوله‌های Pseudomonas aeruginosa تحت مطالعه

شماره الگو	CZ	AZ	CB	PB	CL	GM	CP	تعداد ایزوله ها
۱	R	R	R	S	S	R	S	۱۴
۲	R	R	R	S	R	R	S	۹
۳	R	R	R	S	R	S	S	۸
۴	R	R	S	S	S	R	S	۷
۵	S	S	S	S	R	S	S	۷
۶	R	R	S	S	R	S	S	۶
۷	S	S	S	R	R	S	S	۵
۸	S	S	R	S	R	S	S	۵
۹	R	S	S	S	S	S	S	۵
۱۰	R	R	S	S	R	R	R	۵
۱۱	S	S	S	S	S	S	S	۴
۱۲	R	R	R	S	R	R	R	۴
۱۳	R	R	R	S	S	R	R	۴
۱۴	S	R	S	S	R	S	S	۴
۱۵	S	S	S	S	R	R	S	۴
۱۶	R	R	R	R	R	S	S	۳
۱۷	R	R	S	S	R	R	S	۳

شماره الگو	CZ	AZ	CB	PB	CL	GM	CP	تعداد ایزوله ها
۱۸	S	R	S	S	S	S	S	۲
۱۹	R	R	R	S	S	S	R	۲
۲۰	R	R	R	S	S	S	S	۲
۲۱	R	R	R	R	R	R	R	۱
۲۲	S	S	S	R	R	R	R	۱
۲۳	S	R	R	R	R	S	S	۱
۲۴	S	R	S	R	S	S	S	۱
۲۵	R	S	R	S	R	R	R	۱
۲۶	R	R	R	R	S	R	S	۱
۲۷	S	R	S	R	R	S	S	۱
۲۸	S	S	R	S	S	S	S	۱
۲۹	S	R	R	R	R	R	S	۱
۳۰	R	S	R	S	S	S	S	۱
۳۱	S	R	R	S	R	S	S	۱
۳۲	S	R	R	R	R	R	S	۱
۳۳	S	S	R	S	R	R	S	۱
۳۴	S	R	R	S	R	R	R	۱
۳۵	S	R	R	R	S	R	R	۱
۳۶	R	R	S	S	S	S	S	۱
۳۷	R	R	R	S	R	S	R	۱
۳۸	R	S	S	S	S	S	R	۱
۳۹	S	R	S	S	R	S	R	۱
۴۰	S	R	S	S	S	S	R	۱
۴۱	R	R	S	S	S	S	S	۱

,CZ: Ceftazidim, AZ: Aztreonam, CB: Carbenicillin, PB: Polymixin B, CL: Colistin
GM: Gentamicin, CP: Ciprofloxacin, R: Resistant, S: Sensitive

پس از انجام RAPD-PCR و الکتروفورز محصول آن، ۳۲ الگوی ژنوتیپی بدست آمد. در ژنوتیپ‌های بدست آمده بین یک تا ۸ باند DNA با وزن مولکولی متفاوت حاصل شد که وزن مولکولی باندهای بدست آمده از ۲۵۰ bp تا ۱۰۰۰۰ bp بود (شکل a، b و جدول ۳). از این تعداد ۶۰ ایزوله دارای الگوی مشابه بودند (۴۲ ایزوله با یک باند مشابه، ۲ ایزوله با دو باند مشابه، ۸ ایزوله با سه باند مشابه، ۶ ایزوله با چهار باند مشابه و ۲ ایزوله با هشت باند مشابه بودند) (جدول ۳ و شکل c).



a b c

شکل ۱: a و b، الگوی الکتروفورز RAPD-PCR تعدادی از ایزوله های سودوموناس ائروجینوزای تحت مطالعه همراه با سویه‌ی استاندارد Pseudomonas aeruginosa PAO1.c، الگوی الکتروفورز RAPD-PCR ایزوله‌های سودوموناس ائروجینوزای با الگوهای مشابه، L: Ladder SM 0311.

جدول ۳: تنوع الگوی باندینگ (ژنوتیپ) RAPD-PCR ایزوله‌های سودوموناس ائروجینوزای مطالعه شده

شماره ژنوتیپ	تعداد ایزوله *	الگوی باندینگ (bp)
۱	۱	۱۲۰۰
۲	۱	۱۵۰۰
۳	۴۲	۱۰۰۰۰
۴	۲	۱۰۰۰ و ۷۰۰
۵	۱	۱۰۰۰۰ و ۴۰۰
۶	۱	۱۵۰۰ و ۱۲۰۰
۷	۱	۱۰۰۰۰ و ۱۳۰۰
۸	۲	۹۵۰ و ۷۰۰ و ۵۰۰
۹	۱	۱۰۰۰ و ۹۰۰ و ۷۰۰
۱۰	۲	۱۰۰۰۰ و ۵۰۰ و ۴۰۰
۱۱	۲	۱۰۰۰۰ و ۸۰۰ و ۵۰۰
۱۲	۱	۱۰۰۰۰ و ۹۰۰ و ۵۰۰
۱۳	۱	۱۰۰۰۰ و ۱۰۰۰ و ۶۰۰
۱۴	۱	۱۰۰۰۰ و ۱۰۰۰ و ۷۰۰
۱۵	۲	۱۰۰۰۰ و ۲۵۰۰ و ۱۵۰۰
۱۶	۱	۱۲۰۰ و ۱۰۰۰ و ۹۰۰ و ۷۰۰
۱۷	۱	۳۰۰۰ و ۹۵۰ و ۸۵۰ و ۷۰۰
۱۸	۱	۱۰۰۰۰ و ۸۰۰ و ۵۰۰ و ۴۰۰
۱۹	۱	۱۰۰۰۰ و ۱۰۰۰ و ۸۰۰ و ۴۰۰
۲۰	۱	۱۰۰۰۰ و ۱۰۰۰ و ۷۰۰ و ۶۰۰
۲۱	۱	۱۰۰۰۰ و ۲۰۰۰ و ۸۵۰ و ۷۰۰
۲۲	۳	۱۰۰۰۰ و ۳۰۰۰ و ۲۸۰۰ و ۱۸۰۰
۲۳	۳	۱۰۰۰۰ و ۴۰۰۰ و ۲۸۰۰ و ۱۸۰۰
۲۴	۱	۸۰۰ و ۷۰۰ و ۶۰۰ و ۵۰۰ و ۴۰۰
۲۵	۱	۱۰۰۰۰ و ۸۰۰ و ۶۰۰ و ۵۰۰ و ۴۰۰
۲۶	۱	۱۰۰۰۰ و ۳۵۰۰ و ۲۵۰۰ و ۲۰۰۰ و ۱۵۰۰
۲۷	۱	۳۰۰۰ و ۲۲۰۰ و ۱۴۰۰ و ۹۵۰ و ۸۵۰ و ۷۰۰
۲۸	۱	۱۰۰۰۰ و ۳۰۰۰ و ۲۵۰۰ و ۱۸۰۰ و ۱۵۰۰ و ۷۰۰
۲۹	۱	۱۰۰۰۰ و ۳۰۰۰ و ۲۵۰۰ و ۱۵۰۰ و ۹۵۰ و ۹۰۰ و ۵۵۰
۳۰	۱	۱۰۰۰۰ و ۴۰۰۰ و ۲۸۰۰ و ۱۸۰۰ و ۱۵۰۰ و ۱۰۰۰ و ۷۰۰
۳۱	۲	۲۲۰۰ و ۱۸۰۰ و ۱۵۰۰ و ۹۵۰ و ۷۰۰ و ۵۰۰ و ۳۰۰ و ۲۵۰
۳۲	۱	۱۰۰۰۰ و ۲۲۰۰ و ۱۸۰۰ و ۱۴۰۰ و ۹۰۰ و ۸۵۰ و ۸۰۰ و ۷۰۰ و ۵۰۰

* تعداد ۴۱ ایزوله فاقد هر گونه باند بودند.

جدول ۴: مقایسه ژنوتیپ RAPD با الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های سودوموناس ائروجینوزای تحت مطالعه*

RAPD (شماره ژنوتیپ)	الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی (شماره الگوی حساسیت و مقاومت به آنتی بیوتیک های آزمایش شده)
۳ a	۱، ۱، ۲، ۲، ۲، ۳، ۳، ۳، ۴، ۴، ۵، ۵، ۵، ۵، ۵، ۶، ۶، ۶، ۷، ۷، ۷، ۷، ۸، ۸، ۸، ۹، ۹، ۹، ۱۰، ۱۰، ۱۰، ۱۰، ۱۱، ۱۱، ۱۲، ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۴، ۱۶، ۱۶، ۱۶، ۱۸، ۲۰، ۲۲، ۲۹، ۳۰، ۳۶
۴b	۷، ۱۷
۸ b	۲، ۴
۱۰ b	۶، ۸
۱۱ b	۱، ۱۹
۱۵ b	۱۷، ۳۳
۲۲ c	۳، ۲۷، ۲۹
۲۳ c	۵، ۲۱، ۲۳
۳۱ b	۹، ۲۰

*، اطلاعات نمایش داده شده در این جدول مربوط به ژنوتیپ های RAPD با بیش از یک ایزوله می باشد.

a، تعداد ایزوله در ژنوتیپ: ۴۲ ایزوله; b، تعداد ایزوله در ژنوتیپ: ۲ ایزوله; c، تعداد ایزوله در ژنوتیپ: ۳ ایزوله.

ژنوتیپ RAPD با الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله-های مورد آزمایش نیز مورد مطالعه قرار گرفت و ژنوتیپ‌های دارای بیش از یک ایزوله (ژنوتیپ ۳ با ۴۲ ایزوله، ژنوتیپ‌های ۲۲ و ۲۳ با ۳ ایزوله و ژنوتیپ‌های ۴، ۸، ۱۰، ۱۱ و ۳۱ با ۲ ایزوله) از نظر تطابق در الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی در برابر ۷ آنتی‌بیوتیک مطالعه شدند که نتایج در جدول ۴ نشان داده شده است.

بحث

سودوموناس ائروجینوزا یک باکتری گرم منفی با حضور گسترده در طبیعت بوده و در آب، خاک، و مواد آلی در حال فساد یافت می‌شود. این باکتری عامل مهمی در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی و در افراد مبتلا به ضعف ایمنی از جمله در مبتلایان به بدخیمی‌ها، فیبروز کیستیک و سوختگی می‌باشد (۱۲).

در این مطالعه تعداد ۱۲۴ ایزوله‌ی سودوموناس ائروجینوزای جدا شده از عفونت‌های سوختگی در بیماران بستری در بخش سوانح سوختگی مرکز آموزشی و درمانی سینای تبریز مورد بررسی قرار گرفت. تعیین هویت ایزوله‌ها با تست های مرسوم آزمایشگاهی در آزمایشگاه باکتریولوژی مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز انجام شد. کلیه‌ی ایزوله‌های آزمایشی مولد پیگمان منتشره در محیط کشت مولر هینتون آگار و ستریماید آگار بودند که انواع پیگمان‌ها از جمله پیگمان سبز (کم رنگ و پر رنگ)، زرد مایل به سبز، سبز مایل به آبی و قهوه‌ای بودند. تنوع پیگمان در این باکتری مهم پزشکی از خصوصیات برجسته‌ی این باکتری بوده ودر مطالعات دیگر نیز تنوع پیگمان گزارش شده است (۱۳). در این مطالعه ارتباط معنی‌داری بین رنگ پیگمان و الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی یا ژنوتیپ باکتری‌های آزمایشی بدست نیامد.

یکی دیگر از خصوصیات مهم این باکتری مقاومت دارویی در برابر اغلب خانواده‌های مواد ضد میکروبی و آنتی‌بیوتیک‌ها بوده و این خصوصیت همواره مورد توجه باکتریولوژیست‌ها و متخصصین بیماریهای عفونی جهت اعمال درمان‌های مناسب و موثر بوده است. در این مطالعه از آنتی‌بیوتیک‌هایی با اهداف مختلف (سل وال، غشای سیتوپلاسمی، پروتئین سازی و سنتز اسید نوکلئیک) روی این باکتری استفاده شد تا الگوی حساسیت و مقاومت باکتری‌های آزمایشی در مقابل این عوامل درمانی شناسایی گردد. نتایج حاصل نشانگر حساسیت قابل ملاحظه در برابر پلی میکسین B (۸۶/۳٪) و سیپروفلوکساسین (۸۱/۵٪) بود، در حالیکه سایر عوامل درمانی آزمایش شده توفیقات زیادی را در برابر این باکتری پاتوژن نداشتند، بطوریکه مقاومت به آزترونام ۷۰/۱٪، کولیستین ۶۱/۲٪، سفتازیدیم ۶۶/۱٪، کاربنی‌سیلین ۵۱/۶٪ و جنتامیسین ۴۷/۵٪ ثبت شد (جدول ۱).

از آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی جنتامیسین مورد آزمایش قرار گرفت که ایزوله‌های سودوموناس ائروجینوزای تحت مطالعه ۴۷/۵٪ مقاومت نشان دادند. این یافته با مطالعه انجام شده در انگلستان ۴۷٪ (۱۴)، هندوستان ۵۱٪ (۱۵)، و کرمانشاه ۵۲٪ (۱۶) تطابق داشته، ولی با نتایج بدست آمده در بیمارستان توحید تهران ۹۸٪ (۱۷)، نیجریه ۸۰٪ (۱۸) و ترکیه ۲۷٪ (۱۹) و مطالعه دیگری در ترکیه ۷۰٪ (۲۰) متفاوت است.

میزان مقاومت در برابر سفالوسپورین نسل سوم مورد آزمایش (سفتازیدیم) ۶۶٪ بود. این یافته با سایر مطالعات از ترکیه ۳۹٪ (۱۹)، برزیل ۱۲.۳٪ (۲۱)، انگلستان ۳۹٪ (۱۴) و کرمانشاه ۵۰٪ (۱۶) قابل مقایسه است.

میزان مقامت ایزوله‌های تحت بررسی در این مطالعه در برابر پلی میکسین B به ۱۳/۷٪ رسید و این آنتی‌بیوتیک با ۸۶/۳٪ حساسیت موثرترین آنتی‌بیتیک شناسایی شد. این یافته با سایر مطالعات در جامائیکا ۲۱/۶٪ (۲۲)، زیمبابوه ۵۳٪ (۲۳) و روسیه ۰/۴٪ (۲۴) قابل مقایسه است. در این مطالعه میزان مقاومت دربرابر کولیستین ۶۲٪ ثبت شد که این مقاومت در انگلستان ۳٪ (۱۴)، نیجریه ۱۶/۲٪ (۲۵) و روسیه ۲.۶٪ (۲۶) گزارش شده است.

میزان مقاومت باکتری‌های جداسازی شده در این مطالعه در برابر سیپروفلوکساسین از فلوروکینولون‌ها ۱۸/۵٪ بود. مطالعات دیگر در بیمارستان توحید تهران این مقاومت را ۸۵٪ (۱۷)، کرمانشاه ۳۸٪ (۱۶)، کرمان ۶۸٪ (۲۶)، نیجریه ۷۰٪(۲۷) و در ترکیه ۳۹٪ (۱۹) گزارش نموده‌اند.

میزان مقاومت ایزوله‌های سودوموناس ائروجینوزای آزمایشی در این مطالعه دربرابر آزترونام ۷۰/۱٪ بدست آمد که بالاترین سطح مقاومت در بین آنتی‌بیوتیک‌های آزمایشی بود و با نتایج مطالعه‌ی انجام شده در کرمانشاه (۸۰٪) (۱۶) تطابق داشته، ولی با نتایج اخذ شده در شیراز ۳۵/۹٪ (۲۸)، یونان ۲۷٪ (۲۹) و ترکیه ۴۷٪ (۱۹) مغایرت دارد. در مورد کاربنی‌سیلین نیز ۵۱/۶٪ مقاومت ثبت شد که تطابق خوبی را با مطالعات انجام شده در کرمان ۵۰٪ (۲۶)، فیلیپین ۵۲/۲٪ (۲۱) نشان داد، ولی با نتایج بدست آمده در کرمانشاه ۷۲٪ (۱۶) و هندوستان ۱۱٪ (۱۵) تفاوت دارد.

بنحوی که ملاحظه شد ارقام مرتبط با درصد مقاومت در مناطق جغرافیایی مختلف و کشورهای متفاوت تغییرات زیادی را نشان می‌دهند، و حتی در مطالعات متعلق به یک کشور در سال-های مختلف نتایج کاملا" متفاوتی بدست آمده است که ناشی از فاکتورهای متعدد از جمله نحوه‌ی استفاده از آنتی‌بیوتیک ها و ایجاد فشار انتخابی (selective pressure) روی ارگانیسم، حضور باکتری در محیط درمانی و افزایش احتمال انتقالات ژنتیکی، تفاوت در جمعیت‌های مختلف با رفتارهای متفاوت از نظر بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فاکتورهای دیگر می‌باشد.

تعداد الگوهای حساسیت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های آزمایشی به ۴۱ الگوی متفاوت رسید که در گروه اول ۱۴ ایزوله، در گروه دوم ۹ ایزوله، در گروه سوم ۸ ایزوله، در گروه‌های چهارم و پنجم هرکدام ۷ ایزوله، در گروه ششم ۶ ایزوله، در گروه‌های هفتم تا دهم هرکدام ۵ ایزوله، در گروه‌های یازدهم تا پانزدهم هرکدام ۴

ایزوله، در گروه‌های شانزدهم و هفدهم هرکدام ۳ ایزوله، در گروه-های هیجدهم تا بیستم هرکدام ۲ ایزوله و در بقیه‌ی گروه‌ها از گروه بیست و یکم تا گروه چهل و یکم فقط یک ایزوله قرار گرفتند (جدول ۲). این یافته‌ها موید تنوع الگوی حساسیت آنتی-بیوتیکی در این باکتری پاتوژن بوده و نیاز به انجام تست‌های حساسیت آنتی‌بیوتیکی در آزمایشگاه‌های تشخیصی و دقت کامل در اجرای برنامه‌ی درمانی مناسب را نشان می‌دهد.

خصوصیات فنوتیپی ازقبیل تست‌های بیوشیمیایی، مطالعه‌ی آنتی ژنهای سطحی سلول، الگوی حساسیت ضد میکروبی تحت تاثیر عوامل محیطی و شرایط رشد باکتری قرار داشته و از سوی دیگر تغییرات ژنتیکی محتمل نیز این خصوصیات را تحت تاثیر قرار می‌دهند، لذا استفاده از روش‌های مولکولی در تایپینگ باکتری‌ها از اهمیت بالاتری برخوردار بوده و اساس این نوع مطالعات را به خود اختصاص می‌دهد. در این مطالعه جهت تایپینگ باکتریهای جدا شده از روش RAPD استفاده شدکه بدنبال استخراج DNA از دو پرایمر کوتاه معمول در تایپینگ سودوموناس ائروجینوزا استفاده شد و در ۱۲۴ ایزوله‌ی آزمایشی ۳۲ الگوی RAPD حاصل گشت. این یافته با نتایج بدست آمده از مطالعه‌ی Campbell و همکاران در سال ۲۰۰۰ که در کانادا از ۶۰۰ ایزوله‌ی سودوموناس ائروجینوزا ۱۳۱ الگوی RAPD-PCR گزارش نمودند، مطابقت دارد (۱۲). اما نتایج این مطالعه با تحقیقات انجام گرفته بر روی ایزوله‌های سودوموناس ائروجینوزای بدست آمده از بیماران فیبروز کیستیک (۸ و۹) متفاوت بود. الگوی باندینگ RAPD-PCR نشان داد که الگوی کاملا" مشابهی در بین ایزوله‌ها وجود دارد که احتمال در گردش بودن چند سویه در بین بیماران بخش سوختگی را مطرح می‌سازد (شکل c).

جهت مقایسه‌ی ژنوتیپ RAPD با الگوی حساسیت آنتی-بیوتیکی در باکتری‌های آزمایشی از ژنوتیپ‌هایی که بیش از یک باکتری داشتند استفاده شد و الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله-های متعلق به هر ژنوتیپ شناسایی گردید (جدول ۴). نتایج جدول مذکور تشابه الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی را فقط در ژنوتیپ ۳ که شامل ۴۲ ایزوله بودند نشان می‌دهد و در بقیه‌ی ژنوتیپ‌ها که شامل ۲ یا ۳ ایزوله بودند، هیچگونه تشابه در الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی بدست نیامد، این یافته‌ها در تطابق با سایر یافته‌ها می-باشد (۱۹ و ۳۰).

نتیجه‌گیری

سودوموناس ائروجینوزاهای جدا شده از عفونت‌های سوختگی در این مطالعه بیشترین مقاومت را به آزترونام (۷۰/۱٪) و کمترین میزان مقاومت را به پلی‌میکسین B (۱۳/۷٪) نشان دادند. حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های آزمایشی در ۴۱ الگوی متفاوت قرار گرفت که دلالت برتنوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این باکتری-های مهم پزشکی دارد. نتایج RAPD-PCR نیز نشانگر ۳۲ ژنوتیپ مختلف در باکتری‌های آزمایشی بود. در مقایسه‌ی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها بر اساس ژنوتیپ RAPD صرفاً در یک ژنوتیپ تشابه الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی بدست آمد و اغلب ایزوله‌های متعلق به سایر ژنوتیپ‌ها الگوی حساسیت آنتی-بیوتیکی متفاوتی را نشان دادند. تشابهات مشاهده شده گردش سویه‌های خاص در بین بیماران بخش سوختگی را مطرح می‌سازد و نیاز به کنترل‌های دقیق و پایش‌های میکروبیولوژیک را یاد آور می‌شود..

تقدیر و تشکر

این مطالعه طرح تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز (کد طرح: ۶۳/۸۳) بوده و در آزمایشگاه باکتریولوژی مرکز تحقیقات انجام گرفته است از مسئولین محترم مرکز تحقیقات و نیز از کلیه‌ی بیمارانی که در این مطالعه شرکت داشتند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Akanji BO, Ajele JO, Onasanya A, Oyelakin O. Genetic fingerprinting of *Pseudomonas aeruginosa* involved in nosocomial infection as revealed by RAPD-PCR markers. *Biotechnology* 2011; **10**(1): 70-77.
2. Pirnay JP, Daniel DV, Cochez C, Bilocq F, Pirson J, Struelens M, et.al. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in burn unit. J *Clin Microbiol* 2003; **41**(3): 1192-1202.
3. Hernandez J, Ferrus MA, Hernandez Mand Owen RJ. Arbitrary primed PCR fingerprinting and serotyping of clinical *Pseudomonas aeruginosa* strains. *FEMS Immune Med Microbial* 1997; **17**: 37-47.
4. Poh CL, Yeo CC. Recent advances in typing of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Hosp Infect* 1993; **24**: 175-181.
5. Tenover FC, Albert RD, Goering RV. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: A review for healthcare epidemiologists. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 1997; **18**: 426-439.

6. Daly M, Mahenhiralingam E, Speet DP. Evaluation of random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa* 2000; **38**(12): 4614-4615.
7. Brokopp CD, Farmer JJ. Typing methods for *Pseudomonas aeruginosa*. In EG Dogget ed. *P. aeruginosa*: *Clinical manifestations of infection and current therapy*. Academic Press Inc, New York, 1979, PP: 89-133.
8. Mahenthiralingam E, Cambell ME, Foster J, Lam J, Speert DP. Random amplified polymorphic typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 1996; **34**(5): 1129-1135.
9. Balarini A, Scalet G, Kos M, Cramer N, Wiehlmann L, Jousson O. Molecular typing and epidemiological investigation of clinical populations of *Pseudomonas aeruginosa* using an oligonuleotide- microarray. *BMC Microbial* 2012; **12**: 152.
10. Cormican M, Whyte T, Hanahoe B. Antimicrobial susceptibility testing in Ireland: An introduction to the methods of the CLSI. *NUIG* 2005; **8**: 1-29.
11. Campbell M, Mahenthiralingam E, Speert D. Evaluation of random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 2000; **38**(12): 4614-4615.
12. Abdalnabi JA, Zahraa E. Random amplification polymorphic DNA, a good epidemiologic screening method for nosocomial isolates of *Pseudomonas aeruginosa. European Journal of Biology and Medical Science Research* 2014; **2**(1): 37-44.
13. Freitas AL, Barth AL. typing of *Pseudomonas aeruginosa* from hospitalized patients: A comparison of susceptibility and biochemical profiles with genotype. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2004; **37**(1): 77-82.
14. Pitt TL, Sparrow M, Warner M, Stefanidou M. Survey of resistance of *Pseudomonas aeruginosa* from UK patients with cystic fibrosis to six commonly prescribed antimicrobial agents. *Thorax* 2003; **58**: 794-796.
15. Mehta M, Punia NJ, Joshi RM. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from various clinical specimens. *Indian J Med Microbiol* 2010; **19**: 232-237.
16. Mohajeri P. Antibiotic susceptibility and resistance patterns of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from different clinical specimens in patients referred to the teaching hospitals in Kermanshah. Available from www.kums.ac.ir/majale behbood-7/Mohajeri.doc, (accessed July 2016).
17. Rastegar Lari AR, Alaghehbandan R, Akhlaghi L. Burn wound infections and antimicrobial resistance in Tehran, Iran: An increasing problem. *Annals of Burns and Fire Disasters* 2005; **11**(9): 17-25.
18. Olayinka AT, Onile BA, Olayinka BO. Prevalence of multi drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in surgical units of Ahmdu Bello University Teaching Hospital. Zaria, Nigeria: An indication for effective control measures. Available from http:// www.bioline.ytsc.utoronto.ca/archive/00002932/2005-07-06. 2005.
19. Nazik H, Ongen B, Erturan Z and Salcioglu M. Genotype and antibiotic susceptibility patterns of *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from cystic fibrosis patients. *Jpn J Infect Dis* 2007; **60**: 82-86.
20. Acik L, Kuucukkaraarslan A, Celebi A. Antibiotic susceptibility, plasmid profiles and RAPD-PCR analysis of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Turkey. Available from: www.gazi.edu.tr/ leyacik/rapd.htm, 2005.
21. Cabrera EC, Halos SC, Velmonte MA. Antibiograms, O serotypes and R plasmids of nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *J Microbiol Infect Dis* 1997; **26**: 121-128.
22. Brown PD, Izundu A. Antibiotic resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Jamaica. *Rev Panam Salud Publica* 2004; **16**: 125-130.
23. Igumbor E, Gwanzuru L, Chirara M, Obi C, Muza D. Antibiotic sensitivity and plasmid profiles of *Pseudomonas aeruginosa*. *Cent Afr J Med* 2000; **46**: 296-300.
24. Joseph E, Margaret A, Robert M. In vitro susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates to commonly used antibiotics. *American J Otology* 1996; **17**: 207-209.
25. Ozumba UC, Antibiotic sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* in Enugu, Nigeria. *African J Clinical and Experimental Microbiology* 2003; **4**: 48-51.
26. Shakibaeie MR, Adeli S, Nikian Y. Emergence of iprofloxacin resistance among *Psudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *Iranian J Medical sciences* 2001; **26**: 155-159.
27. Smith S, Ganiyu O, John R, Fowora M, Akinsinde K, Odeigah P. Antimicrobial resistanne and molecular typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from surgical wound in Lagos, Nigeria. *Acta Medica Iranica* 2012; **50**(6): 433-438.
28. Farjadian S, Kaviani MJ, Ghaderi A. Molecular analysis of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated

from hospitalized patients in Shiraz. *Iranian Journal of Medical Sciences* 1996; **21**: 112-118.

29. Tsakris A, Pournaras S, Woodford NI, Alepou MF, Babini GS, Douboyas G, et.al. Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. *J Clinical Microbiology* 2000; **38**: 1290-1292.

30. Rao AS, Shekar M, Raghuveer CV, Karunasagar IN, Karunasagar ID. RAPD-PCR typing of Pseudomonas *aeruginosa* strains isolated from peripheral venous catheters. *Current Research in Microbiology and Biotechnology* 2014; **2**(5): 462-465.