مقاله تحقیقی

تعیین فراوانی ژن *ToxA* سودوموناس *آئروژینوزا* در نمونه های بالینی و محیطی

بهاره قبادی ساکی[1]، فاطمه نوربخش*[1]، راحله صفایی جوان[2]

۱. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین-پیشوا، دانشکده علوم زیستی، گروه میکروبیولوژی، ورامین- پیشوا، ایران
۲. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین-پیشوا، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوفیزیک ، ورامین- پیشوا، ایران
***مسئول مکاتبات:** دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین-پیشوا، دانشکده علوم زیستی، گروه میکروبیولوژی،، ورامین- پیشوا، ایران. تلفن: ۰۹۱۲۲۰۴۳۶۵۴، آدرس الکترونیکی: Email:niloofar_noorbakhsh@yahoo.com

محل انجام تحقیق: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین-پیشوا، دانشکده علوم زیستی ، گروه میکروبیولوژی

تاریخ دریافت: ۹۵/۹/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۲/۱۸

چکیده

سودوموناس آئروژینوزا یک باکتری فرصت طلب و یکی از مهمترین عوامل عفونت های بیمارستانی محسوب می شود. این باکتری می تواند انواع عفونت های بیمارستانی از عفونت ادراری تا باکتریمی را ایجاد کند. اگزوتوکسین A سم اصلی تولید شده توسط این باکتری و یکی از عوامل مرگ و میر میباشد. این مطالعه با هدف شناسایی ژن *ToxA* در نمونه های بالینی و محیطی انجام شد. در این مطالعه ۵۰ سویه بالینی سودوموناس آئروژینوزا از زخم، ریه، ادرار، مدفوع، گوش و خون و ۵۰ نمونه محیطی از آب، خاک و گل و لای جدا شد و با تست های بیوشیمیایی شناسایی گردید، سپس از نمونه های جدا شده DNA استخراج شد و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی PCR انجام شد. از ۵۰ نمونه بالینی مورد مطالعه ۲۴ (۴۸٪) باکتری متعلق به مردان و ۲۶ (۵۲٪) نمونه *سودوموناس ائروژینوزا* متعلق به زنان بود. فراوانی ژن کدکننده *ToxA* در نمونه های بالینی ۴۴ (۸۸٪) باکتری مشاهده شد. از ۵۰ نمونه محیطی (۶۰٪) ۳۰ باکتری از آب، (۲۰٪) ۱۰ باکتری از خاک و ۱۰ (۲۰٪) باکتری از گل و لای جدا شد. (۷۴٪)۳۷ باکتری جدا شده از نمونه های محیطی دارای ژن *ToxA* بودند. نتایج نشان داد ژن *ToxA* یکی از مهمترین ژن‌های ویرولانس در نمونه های بالینی با درصد فراوانی ۸۸٪ نسبت به نمونه های محیطی با ۷۴٪ بود.

واژه های کلیدی: *سودوموناس ائروژینوزا*، ژن *ToxA*، نمونه بالینی و محیطی

فصلنامه علمی پژوهشی دانش زیستی ایران
جلد ۱۰- شماره۴- زمستان ۱۳۹۴

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا باکتری پاتوژن فرصت طلب گرم منفی و هوازی است بوسیله یک یا چند فلاژل قطبی حرکت می‌کنند (۱). *سودوموناس آئروژینوزا* بیماریزای فرصت طلب است و از سیستم ایمنی ناتوان افراد استفاده کرده و عفونت ایجاد می‌کند. سودوموناس آئروژینوزا سبب عفونت‌های مجاری ادراری، سیستم تنفسی، التهاب و آماس پوستی، عفونت بافت‌های نرم، باکتریمی، عفونت‌های استخوان، عفونت های معده وروده‌ای و عفونت‌های سیستماتیک گوناگون به ویژه در بیماران مبتلا به سوختگی‌های شدید و بیماران دچار سرطان و ایدز که سیستم ایمنی آنها سرکوب شده است، می‌نماید. این باکتری بویژه در افرادی موجب عفونت می‌شود که دچار سیستیک فیبروزیس هستند و مکان عفونت ها است (۳). اصولاً این باکتری پاتوژن بیمارستانی است و بیشتر از راه میوه، گیاهان، سبزی‌ها، عیادت کننده‌ها و بیمارانی که از بخش‌های دیگر منتقل می‌شوند ،وارد پیرامون بیمارستان می شود (۳). این باکتری دارای عوامل ویرولانس فراوانی می‌باشد که شامل تاژک، فیمبریه، پیگمان، آنزیم پروتئاز، الاستاز، فسفولیپاز، اگزوتوکسین می‌باشد (۱).

اگزوتوکسین A، سم اصلی تولید شده توسط این باکتری و یکی ازعوامل مرگ و میر می‌باشد. اگزوتوکسین A از ۶۱۳ اسیدآمینه با وزن مولکولی (۶۶KD) تشکیل شده است. این توکسین باعث غیرفعال شدن EF (فاکتور طویل کننده) وتوقف سنتز پروتئین می‌گردد که در نتیجه موجب کشته شدن سلول‌ها می‌شود. اگزوتوکسین A دارای سه ناحیه است:

ناحیه I: به رسپتورهای سلول میزبان متصل شده واندوسیتوز را آغاز می کند (اسیدی شدن آندوزوم).

ناحیه II: حرکت توکسین به سیتوپلاسم میزبان را سبب می شود.

ناحیه III: انتقال ADP-ریبوز به EF_2 را کاتالیز می نماید.

جایگاه I از ۲ جایگاه (Ia، Ib) تشکیل شده است. جایگاه Ia (1-252aa) در واقع مسئول اتصال به گیرندهٔ سلول است. حذف و جهش در اسیدآمینهٔ موقعیّت ۵۷ (Ia) باعث غیرفعال شدن اگزوتوکسین A و مهار اتصال سم به سلول می‌گردد. نقش جایگاه Ia هنوز مشخص نشده است. حذف بخشی از دامنهٔ Ib (365-380aa) هیچ تأثیری بر روی سمیت اگزوتوکسین A ندارد (۴).

اسید آمینه لیزین (LYS) در انتهای کربوکسیل اگزوتوکسین A توسط کربوکسیل پپتیداز شکسته شده و باعث اتصال سم به گیرنده‌های الفا ۲ ماکروگلوبولین سلول-های یوکاریوت می‌شود. افزایش آمین محیط باعث جهش ژن (toxc) و مهار بیان اگزوتوکسین A توسط باکتری سودوموناس آئروژینوزا می‌شود (۵).

اگزوتوکسین A در *سودوموناس آئروژینوزا* و توکسین دیفتری از لحاظ فعالیّت آنزیماتیک یکسان هستند. امّا ازنظر ایمونولوژیکی نقاط متفاوتی را مورد هدف قرار می-دهند. به طوری که توکسین دیفتری بیشتر بافت‌های قلبی و اگزوتوکسین A *سودوموناس آئروژینوزا* کبد و بافت‌های وابسته به آن را بیشتر به عنوان نقاط هدف و اثربخشی توکسین قرار می‌دهد (۶).

ماکزیمم تولید ژن Tox A در آزمایشگاه زمانی رخ می‌دهد که *سودوموناس آئروژینوزا* در دمای ۳۲ درجه سانتی گراد رشد می‌نماید.

ژن اگزوتوکسین A باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* به صورت ثابت روی کروموزوم باکتری قرار دارد، بنابراین برای تشخیص این میکروارگانیسم می‌توان از ژن ToxA در واکنش زنجیره پلی مراز استفاده کرد (۷). لذا، هدف از این تحقیق تعیین فراوانی ژن کد کننده *ToxA* در نمونه‌های بالینی و محیطی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه های بالینی

قبل از نمونه‌گیری از بیماران فرم رضایت نامه در اختیار بیمار قرار گرفت وپس از اعلام رضایت نمونه‌گیری انجام شد. نمونه‌های مورد مطالعه شامل زخم، ادرار، خون، خلط و مدفوع بودند که از بیماران بستری در بیمارستان‌های امام حسین، رسول اکرم (ص) و پارس به دست آمد. نمونه‌ها به محیط BHI مایع منتقل شد.

نمونه های محیطی

نمونه‌های جمع آوری شده از آب ،گل و لای چسبیده به سبزی‌ها و خاک مربوط به پارک‌های جنگلی (چیتگر و سرخه حصار) جمع آوری شد و در سرم فیزیولوژیک رقیق کرده و به محیط BHI مایع منتقل شد. تمامی محیط های کشت جهت رشد میکروبی به مدت ۲۴ ساعت با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد.

شناسائی باکتری‌ها

باکتری‌های رشد کرده در محیط کشت BHI مایع، در محیط‌های EMB آگار جهت جداسازی باکتری‌های گرم منفی کشت داده شدند. سویه‌های مشکوک به سودوموناس نیز در محیط اختصاصی سیتراماید آگار کشت داده شد.

تست‌های تشخیصی باکتری‌های گرم منفی غیرتخمیر کننده (سودوموناس آئروژینوزا)

جهت شناسائی سودوموناس از تست‌های تشخیصی باکتری‌های گرم منفی شامل TSI، سیمون سیترات، SIM و MRVP استفاده گردید. علاوه بر آن از تست های کشت در محیط سیتراماید و اکسیداسیون گلوکز هم استفاده شد.

استخراج DNA ژنومی

جهت استخراج DNA ژنومی همه جدایه‌های باکتریایی جدا شده از بیماران و محیط از کیت استخراج DNA شرکت پویا ژن ازما استفاده شد. سپس برای تعیین

کیفیت DNA ژنومی استخراج شده به همراه یک DNAمعین و استاندارد (DNA فاژ λ) بر روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شدند استفاده از این روش بیشتر به جهت اطمینان از کیفیت مطلوب DNA استخراج شده می-باشد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)جهت تکثیر ژن *ToXA*

برای انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز(PCR) جهت تکثیر ژن *ToXA* پرایمرها از مقاله (۸) که توالی آن در جدول ۱ آورده شده است، استفاده شد. مواد مورد نیاز برای انجام PCR با غلظت های زیر و در حجم واکنش 25 میکرولیتر بر طبق جدول ۲ استفاده گردید.

جدول ۱: توالی پرایمرهای ژن *ToxA* .

ToxA-s	CTGCGCGGGTCTATGTGCC	270bp
ToxA-As	GATGCTGGACGGGTCGAG	

جدول:۲ غلظت مواد مورد استفاده در واکنشPCR

اجزای واکنش	غلظت نهایی
Master Mix	12.5µl
DNA	10-100ng
Forward primer	10 Pmol
Reverse primer	10Pmol
H2O(D.W)	10 µl
Total volume	25 µl

سیکل حرارتی مورد استفاده جهت تکثیر ژن *ToxA*

برنامه‌ریزی دستگاه ترموسایکلر برای ژن *ToxA* در ۲۵ سیکل حرارتی شامل دمای دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه، دمای دناتوراسیون ۹۵ درجه به مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال پرایمر ۶۰ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه انجام شد، سپس محصول PCR در ژل آگارز ۲ درصد قرار گرفته با 6x Loading رنگ آمیزی و تحت اشعه UV عکس برداری گردید. از مارکر ۱۰۰bp تولید شرکت سیناژن برای شناسایی محصول PCR استفاده شد.

آنالیز آماری

برای تعیین فراوانی ژن ها با فاکتورهای مورد مطالعه شامل سن، جنسیت، نوع نمونه های گرفته شده از بیماران و نمونه های محیطی و نیز فراوانی ژن های جدا شده از نمونه ها ازنرم افزار Excel استفاده شد.

نتایج

فراوانی جنسیت افراد مورد مطالعه

۵۰ نمونه بالینی جدا شده از بیماران که ۲۶ نمونه متعلق به زنان و ۲۴ نمونه متعلق به مردان بود، که ۵۲٪ زن و ۴۸٪ مرد بودند.

فراوانی نمونه‌های محیطی

۵۰ نمونه محیطی جدا شده شامل ۳۰ نمونه آب جوی، ۱۰ نمونه گل و لای سبزی و۱۰ نمونه خاک پارک جنگلی بود که در نمودار ۱ قابل مشاهده است.

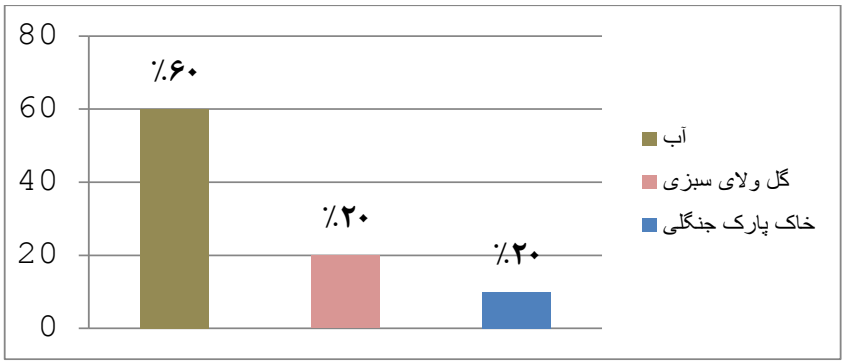
فراوانی نمونه های بالینی

۵۰ نمونه بالینی جدا شده از بیماران که شامل ۱۵ نمونه ادرار، ۱۴ نمونه زخم، ۱۳نمونه خلط، ۵ نمونه خون، ۲ نمونه مدفوع و ۱ نمونه گوش بود که در نمودار ۲ قابل مشاهده است.

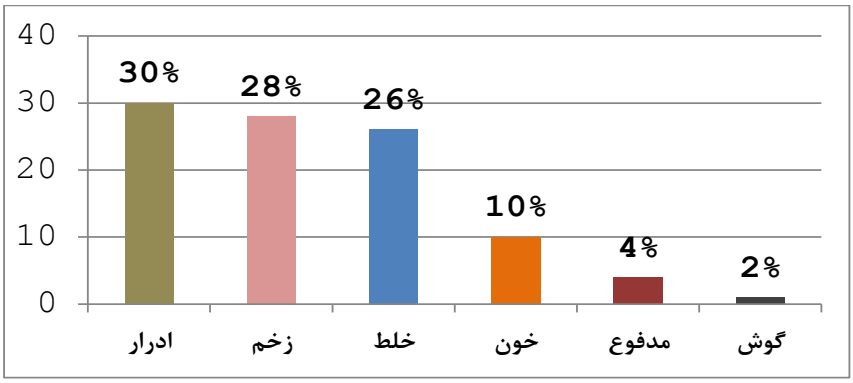
نتایج حاصل از تکثیرژن *ToxA*

پس از استخراج DNA نمونه‌های بالینی و محیطی همه نمونه ها با پرایمر های کد کننده ژن *ToxA* تکثیر شدند.

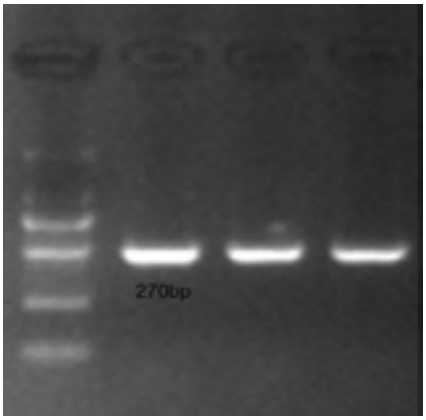
اندازه باند ژن کد کننده 270bp بود که نتایج در تصویر ۱ نشان داده شده است.



نمودار ۱ - درصد فراوانی نمونه های محیطی.



نمودار ۲ - درصد فراوانی نمونه های بالینی جدا شده از بیماران.



شکل ۱ - نتایج حاصل از تکثیر ژن *ToxA* ، ۱-۳: نمونه های مورد مطالعه، ۴: مارکرbp ۱۰۰

فراوانی ژن *ToxA* در نمونه‌های بالینی

در ۱۴ نمونه بالینی زخم ۱۳ نمونه دارای ژن *ToxA*، در ۱۵ نمونه ادرار ۱۱ نمونه دارای ژن *ToxA*، در ۱۳ نمونه خلط ۱۳ نمونه دارای ژن *ToxA*، در ۵ نمونه خون ۴ نمونه دارای ژن *ToxA*، در ۲ نمونه مدفوع ۲ نمونه دارای ژن *ToxA* بود که در نمودار ۳ قابل مشاهده است.

فراوانی ژن *ToxA* در نمونه‌های محیطی

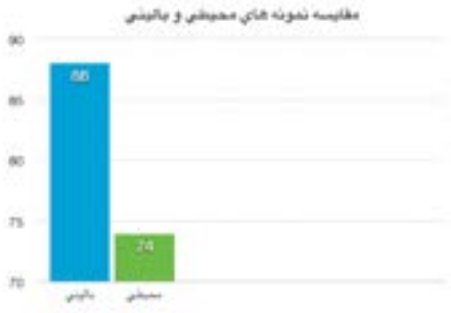
در ۳۰ نمونه محیطی آب همه نمونه‌ها دارای ژن *ToxA* بودند، در ۱۰ نمونه گل و لای ۶ نمونه دارای ژن *ToxA*و در ۱۰ نمونه خاک پارک‌های جنگلی هیچ کدام از نمونه‌ها دارای ژن *ToxA* نبودند که در نمودار ۴ قابل مشاهده است.

مقایسه فراوانی ژن *ToxA* در نمونه‌های بالینی و محیطی

در ۵۰ نمونه بالینی مورد مطالعه ۴۳ نمونه دارای ژن *ToxA* و در ۵۰ نمونه محیطی مورد مطالعه ۳۷ نمونه دارای ژن *ToxA* که در نمودار ۵ قابل مشاهده است.

نمودار ۳ - درصد فراوانی *ToxA* درنمونه‌های بالینی.

نمودار ۴ - فراوانی ژن *ToxA* در نمونه‌های محیطی.



نمودار ۵ - فراوانی ژن *ToxA* در نمونه‌های بالینی و محیطی.

بحث

سودوموناس آئروژینوزا یک باکتری فرصت طلب است و بر روی بدن و اکثر سطوح می‌تواند رشد کند. این باکتری را می‌توان در محیط‌های گوناگون نظیر آب، مواد غذایی، سبزی‌های قابل خوردن، محیط بیمارستان و حتی روی یا داخل وسایل پزشکی مانند کاتترها مشاهده کرد که سبب ایجاد عفونت‌های بیمارستانی و کلینیکی می‌شود (۳). گسترش و انتشار بیماری به بیمار دیگر به وسیله دست‌های کارکنان بیمارستان‌ها و هم چنین تماس مستقیم بیمار با منابع آلوده مانند خوردن آب یا خوراک آلوده رخ می دهد (۳).

اگزوتوکسین A(*ToxA*) یکی از مهمترین فاکتورهای *سودوموناس آئروژینوزا* است و بیشتر سویه های کلینیکی جدا شده آن را تولید می نمایند (۶). از این رو در این مطالعه، فراوانی ژن *ToxA* که مهمترین فاکتور ویرولانس *سودوموناس آئروژینوزا* است در نمونه های بالینی و محیطی مورد بررسی قرار گرفت.

در مطالعات فاضلی و ممتاز در سال ۲۰۱۴ بررسی توزیع عوامل بیماری زا *Pseudomonas aeruginosa* جدا شده از انواع مختلفی از عفونت‌های بیمارستانی در ایران انجام شده است. ۶۵ درصد (در نمونه های مرد) و ۲۱٪ (در نمونه های زن) عفونت دستگاه تنفسی *سودوموناس آئروژینوزا* داشتند. در مطالعه حاضر۵۲٪ نمونه‌ها جدا شده از زنان و ۴۸٪ از مردان بود و بالاترین میزان جداسازی سودوموناس از نمونه‌های ادراری با ۱۱٪ فراوانی مشاهده شد. بنابراین شیوع عفونت بر حسب نوع نمونه بالینی در دو جنس زن و مرد متفاوت است. در مطالعه فاضلی و همکارانش شیوع ژن *ToxA* ٪۷۵ در میان ایزوله‌ها مشاهده شد (۸). در مطالعه حاضر شیوع *ToxA* ٪۸۸ در نمونه‌های بالینی و ۷۴٪ در نمونه‌های محیطی بود، فراوانی بالای ژن *ToxA* در نمونه‌های بالینی و محیطی نشان دهنده این مطلب است که این ژن یکی از ژن های مهم این باکتری است و بنابراین در اغلب سویه‌ها وجود دارد.

مونا خطاب و همکارانش در مطالعه‌ای در سال۲۰۱۵ در مصر بیان کردند *سودوموناس آئروژینوزا* دارای تعداد زیادی از فاکتورهای بیماریزایی از قبیل اگزوتوکسین A، Exoenzym، nan و ژن las است. در میان ایزوله‌های بالینی حضور ژن *ToxA* در ایزوله جدا شده از سوختگی و دستگاه تنفسی به طور قابل توجهی بالاتر از خون بود (۹).

در مطالعه دیگری بیش از ۸۰ درصد سودوموناس‌های جدا شده از ادرار دارای ژن *ToxA* بودند (۱۰). همچنین درصد بالایی از وجود این ژن در سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از دستگاه تنفسی مشاهده شد (۱۱). در مطالعه حاضر هم حضور *ToxA* در نمونه‌های مربوط به خون کمتر از سایر نمونه‌ها بود و شیوع بالایی در نمونه‌های خلط مشاهده شد، که با توجه اینکه این باکتری ویرولانس بالاتری درنمونه‌های سوختگی و عفونت دستگاه تنفسی دارد وجود ژن ویرولانس *ToxA* که نقش بالایی در پاتوژنیسیته عفونت دارد می تواند توجیهی در عفونت بیشتر در این نواحی باشد.

طبق مطالعات Vasil و همکارانش در سال ۱۹۸۶ در امریکا دو پروب پوشش ساختاری ژن کد کننده اگزوتوکسین A در آزمایش هیبریداسیون کلونی برای تعیین اینکه آیا توالی همولوگ ژن *ToxA* می تواند در گونه دیگری از سودوموناس و در گونه های *سودوموناس آئروژینوزا* باشد مورد بررسی قرارگرفت. وجود ژن *ToxA* در *P. aeruginosa* حدود ۹۵٪ است و مربوط به گونه است و در سایر گونه های سودوموناس وجود ندارد و حداقل یک کپی از ژن *ToxA* در ژنوم هر سویه وجود دارد (۶). در مطالعه حاضر نیز حضور *ToxA* در نمونه های بالینی ۸۸ ٪ و در نمونه های محیطی ۷۴ ٪ بود.

در مطالعه ای که توسط بهرام امینی و همکارانش در سال ۱۳۸۹ بر روی همسان سازی جایگاه کاتالیتیک اگزوتوکسین A *سودوموناس آئروژینوزا* انجام گرفت نشان داد که ۹۰ درصد باکتری‌های جداشده دارای سم اگزوتوکسین A بوده و سویه‌های جدا شده از ایران نیز با توالی‌های گزارش شده در بانک ژن بین المللی مشابه بودند (۲).

Sabarwal و همکارانش در سال ۲۰۱۴ به بررسی کروم سنسینگ و فاکتورهای ویرولانس *سودوموناس آئروژینوزا* پرداختند که نتیجه گرفتند ژن های ویرولانس *aprA, rhlAB, plcH, lasB, toxA* and *fliC* در عفونت ادراری نقش به سزایی دارند (۱۲) . در مطالعه حاضر نیز نمونه های جدا شده از ادرار با حضور ژن ویرولانس *ToxA* (٪۷۴) نقش مهمی در ویرولانس دارند.

Nikbin و همکارانش در سال ۲۰۱۲ با بررسی ژن‌های ویرولانس *سودوموناس آئروژینوزا* در نمونه‌های بالینی به این نتیجه رسیدند که از ۲۶۸ نمونه شیوع ژن *ToxA* و

nanI در نمونه های سوختگی و ریه بالاتر بود (۱۳). در این بررسی شیوع *ToxA* ۸۸٪ و مطابق با مطالعه ی فوق در نمونه های زخم و خلط بیشترین شیوع را داشت.

Vives بر روی خصوصیات ویرولانس *سودوموناس آئروژینوزا* محیطی جدا شده ازخاک‌های داری آلودگی نفتی ونمونه‌های بالینی مطالعاتی انجام داد و مشاهده کرد که این دو گروه از باکتری‌ها از نظر خصوصیات ویرولانس تفاوتی ندارند (۱۴).

Grosso-Becerra و همکاران محتوای ژنتیکی ۱۷ سویه *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از آب، گیاهان، دلفین و انسان را بررسی کردند و مشاهده کردند که همگی در یک clade قرار می‌گیرد و تفاوت کمی از نظر ژنتیکی بین آنها وجود دارد و آنها به زیر گروه طبقه بندی نمی شوند بلکه برحسب منشا محیطی به cluster دسته بندی می‌گردند و نمونه‌های بالینی بسیار نزدیک به نمونه‌های جدا شده از آب و گیاه و دلفین است (۱۵).

از مطالعات فوق این گونه استنباط میشود که تا کنون مطالعات زیادی بر روی شناسایی *سودوموناس آئروژینوزا* فاکتورها و ژن‌های بیماری زای آن صورت گرفته است اما این مطالعات بیش تر بر روی نمونه‌های بالینی بوده و های محیطی کم تر مورد مطالعه قرار گرفتند. در مطالعه حاضر مقایسه وجود ژن ویرولانس *ToxA* در نمونه‌های بالینی و محیطی صورت گرفت که نتیجه حاصله نشان دهنده فراوانی بالای ژن *ToxA* در نمونه‌های بالینی و محیطی بود. طبق مطالعات انجام شده فراوانی این ژن در *سودوموناس آئروژینوزا* بالاست و اکثر سویه‌ها دارای این ژن می باشند ولی در هر شرایطی بیان نمی گردد و بیان شدن آن بستگی به شرایط محیطی دارد.

تقدیر و تشکر

به این وسیله از زحمات کلیه پرسنل آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی پیشوا که ما را مورد لطف قرار داده ودر انجام این پروژه همکاری نموده صمیمانه تقدیر و تشکرمی نمایم.

منابع مورد استفاده

۱. محمدی‌مهر، م.، عبدی، ع.، ۱۳۸۷. اثر آنتی بیوتیک های کینولونی و ماکرولیدی بر سلول های پلانکتونیک و بیوفیلم در شرایط آزمایشگاهی، فصلنامه ی بیماری های عفونی و گرمسیری، سال سیزدهم، شماره ۴۱، صفحات ۱۷ تا ۲۲.

۲. امینی، ب.، کمالی، م.، زارعی محمودآبادی، ع.، مرتضوی، ی.، حبیبی، ا.، بیات. ا.، فرهادی، ن.، جوادی، ح.، کیهان، ا.، ۱۳۸۹. همسانه سازی جایگاه کاتالیتیک اگزوتوکسین A سودوموناس آیروژینوزا، مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی زنجان. دوره ۱۸، شماره ۷۱، ص ۳۳-۲۴.

3. Murray, P., Rosental, K., Kobayashi, G., Faller. M., 2015. Medical Microbiology. Amrican society of microbiology. 8th edition. Copright Elsevier 2016. Pp. 719-728.
4. Koneman, E. W., Allen, S. D., Schreckenberg, P. C., Winn, W. C., 2010. Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 4th ed. JB Lippincott Philadelphia.
5. Gladman, G., connor, P. J., William, S. R. F., David, T. J., 1992. Controlled study of *pseudomonas cepacia* and *pseudomonas maltophilia* in cystic fibrosis. Arch Dis Child 67(2):192-195.
6. Vasil, M. L., Chmberlain, C., Grant, C. C., 1986. Molecular studies of pseudomonas exotoxin A gene. Infect Immun 52(2): 538-548.
7. Forbes, B. A., Sahm, D. F., 2002. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology, 11th Edition, Philadelphia. Mosby, St. Louis, 2002, pp. 711-798.
8. Fazeli, N., Momtaz, H., 2014. Virulence gene profiles of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Iranian hospital infections. Iran Red Crescent Med J 16(10): e15722.
9. Khattab, M., Nour, M. S., Elsheshtawy, N. M., 2015. Genetic identification of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes among different isolates. Microbiochem Technol 7(5): 274-277.
10. Wolska, K., Szweda, P., 2009. Genetic features of clinical *P. aeruginosa* strians. Polish J Microbiol 58: 255-260.
11. Cotar, A. I., Chifiriuc, M. C., Banu, O., Lazar, V., 2013. Molecular characterization of virulence patterns in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from respiratory and wound samples. Biointerface Res Appl Chem 3: 551-558.
12. Sabharwal, N., Dhall, Sh., Chhibber, S., Harjai, K., 2014. Molecular detection of virulence genes

as markers in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from urinary tract infections. Int J Mol Epidemiol Genet 5(3): 125–134.
13. Nikbin, V. S., Aslani, M. M., Sharafi, Z., Hashemipour, M., Shahcheraghi, F., Ebrahimipour, G. H., 2012. Molecular identification and detection of virulence genes among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from different infectious origins. Iran J Microbiol 4(3): 118-123.
14. Vives, M., Garnica, F. D., 2006. Comparison of virulence between clinical and environmental *Pseudomonas aeruginosa* isolates. International Microbiology 9: 247-252.
15. Grosso-Becerra, M. V., Medellí Ch. S., Valdez, A. G., Méndez, J. L., Delgado, G., Espinosa, R. M., 2014. *Pseudomonas aeruginosa* clinical and environmental isolates constitute a single population with high phenotypic diversity. BMC Genomics 15: 318.