

Determine the antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from raw milk

Faeze Zadsafar¹, Mohsen Zargar^{1*}, Seyyed Soheil Aghaei¹

¹Department of Microbiology, Faculty of Science, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran

Abstract

Background and Objectives: *Pseudomonas aeruginosa*, a pathogen bacteria, that is resistance to antibiotics and can be used in patients with immune deficiency and cause disease. This study aimed to determine the antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from raw milk and multiple resistance of the isolates and ESBL isolates.

Method: Initially, 117 *Pseudomonas aeruginosa* isolates from dairy products were confirmed by the standard methods of microbiology and then evaluated the antibiotic resistance of 10 strains against 10 antibiotic which selected from different categories according to the CLSI standard.

Results: In the study of antibiotic resistance Ceftazidime antibiotic showed most Antibiotic resistance and amikacin antibiotic polymyxin B antibiotic resistance and lowest, respectively. 27 isolates (23%), multiple drug resistance (MDR), the three classes of antibiotics showed and 86 isolates were resistant to the ceftazidime antibiotic (73.5%) isolates, of which 28 were positive ESBL (32.55%).

Conclusion: Due to high prevalence *Pseudomonas aeruginosa* in raw milk, and existence of antibiotic resistance genes in bacteria, it is necessary to apply appropriate strategies for livestock health control, to prevent the spread of bacteria.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; dairy products; microbial drug resistance; multiple drug resistance

* Corresponding Author: Mohsen Zargar, Department of Microbiology, Faculty of Science, Unit Qom, Islamic Azad University, Qom, Iran. Email: zmohsen2002@yahoo.com Phone 09121539288

تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از شیر خام

فائزه زادصفر^۱، محسن زرگر^{۱*}، سیدسهیل آقائی^۱

^۱ گروه میکروبی شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: سودوموناس آئروژینوزا، پاتوژن فرصت‌طلبی است که مقاومت بالایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها دارد و می‌تواند در بیماران دچار نقص سیستم ایمنی، ایجاد بیماری کند. این تحقیق با هدف تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از شیر خام و نیز بررسی مقاومت چندگانه و تعیین ایزوله‌های ESBL انجام شد.

روش بررسی: ابتدا ۱۱۷ سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از محصولات لبنی با روش‌های استاندارد میکروبیولوژی تایید شدند و سپس مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها در مقابل ۱۰ آنتی‌بیوتیک منتخب از رده‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی طبق استاندارد CLSI بررسی شد.

یافته‌ها: در بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک سفنازیدیم و کمترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک آمیکاسین و پلی میکسین ب به دست آمد. ۲۷ جدایه (۲۳٪)، مقاومت دارویی چندگانه (MDR)، به سه کلاس آنتی‌بیوتیکی نشان دادند و ۸۶ جدایه به آنتی‌بیوتیک سفنازیدیم مقاوم بودند (۷۳/۵٪) که ۲۸ جدایه از این تعداد ESBL مثبت بودند (۳۲/۵۵٪).

نتیجه‌گیری: با توجه به شیوع بالای سودوموناس آئروژینوزا در شیرخام و وجود ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک در باکتری، اعمال راهکارهای مناسب جهت کنترل بهداشت در دامداری‌ها، برای جلوگیری از انتشار باکتری ضروری است.

کلید واژه: سودوموناس آئروژینوزا؛ محصولات لبنی؛ مقاومت دارویی میکروبی؛ مقاومت دارویی چندگانه

* نویسنده مسئول مکاتبات: محسن زرگر، گروه میکروبی شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران.

سودوموناس آئروژینوزا، باسیل گرم منفی، هوازی اجباری، غیرتخمیری متحرک با تک تاژه قطبی با نیازهای غذایی حداقل است (۱). عوامل ویروالانس متنوعی چون توکسین‌ها، آنزیم‌ها، فلاژل، پیلی، آلزینات، LPS و پروتئازها در چسبیدن این باکتری به سلول‌های میزبان و بیماری‌زایی آن نقش دارند. دوام و ماندگاری این باکتری با توانایی تشکیل بیوفیلم مرتبط می‌باشد. استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها در سال‌های اخیر موجب شده که این باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها از گروه‌های مختلف مقاوم شود، به طوری که در حال حاضر وجود سویه‌های با مقاومت چندگانه نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، مشکل اصلی در مبارزه با این باکتری می‌باشد. کاهش نفوذپذیری غشا خارجی، تولید بتالاکتاماز کروموزومی و تغییر در سیستم‌های تراوشی از عوامل اصلی مقاومت ذاتی باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها محسوب می‌شود (۲، ۳). یکی از مهمترین عوامل بیماری‌زایی سودوموناس آئروژینوزا، آنزوتوکسین A می‌باشد. آنزوتوکسین A یک محصول خارج سلولی است که تقریباً در ۹۰٪ سودوموناس آئروژینوزاها، تولید می‌شود (۴، ۵). از مهمترین مکانیسم آنزوتوکسین A، تنظیم ژن‌های مقاومت و تنظیم برنامه‌ریزی مجدد مسیرهای بیوسنتتیک در باکتری است که باعث مقاوم شدن سلول باکتری در برابر عوامل ضد میکروبی می‌شود و بقای باکتری تثبیت می‌گردد (۶). سودوموناس یکی از عوامل فساد مواد غذایی مثل لبنیات، گوشت و تخم مرغ می‌باشد. زیرا توانایی رشد در دمای یخچال را دارد، سرعت رشد و تکثیر بالایی دارد و باعث ایجاد چسبندگی در سطح مواد غذایی می‌شود. آنزیم‌های باکتری سودوموناس ممکن است در طول ذخیره سازی سرد شیر خام، تولید شود و پس از آن در سه جزء اصلی شیر، یعنی پروتئین‌ها، چربی‌ها و کربوهیدرات‌ها اثر کند (۷). سودوموناس تولید لیپاز و پروتئاز مقاوم به حرارت می‌کند که باعث تلخی، ترشیدگی و تجزیه کازئین همراه با تولید محصولات لزج و انعقاد پروتئین می‌شود (۸، ۹). بسیاری از آنزیم‌های این باکتری می‌توانند کیفیت و قدرت ماندگاری محصولات لبنی فرآوری شده را کاهش دهند. برخی از آنزیم‌ها قادر به مختل کردن تمامیت ارضی غشاء مولکول چربی شیر می‌باشند. این باکتری به عنوان یک مشکل تکرار شونده، در نگهداری شیر در یخچال و توزیع محصولات لبنی و مواد فاسد شدنی، شناخته شده است (۱۰). تبدیل شدن آن به میکروفلور غالب در هنگام ذخیره سازی شیر در سرما و آنزیم‌های خارج سلولی آن، باعث فساد محصولات لبنی می‌شود (۹، ۱۱). وجود این باکتری و محصولات آن در شیر ممکن است شاخص از آلودگی مدفوعی در نظر گرفته شود. پروتئولیز عامل اصلی کاهش زمان نگهداری شیر است، به دلیل تغییرات در عطر و طعم و بافت و شکل نهایی به صورت یک ژل است، این فرایند از اهمیت ویژه اقتصادی برخوردار است (۸). در راستای این پژوهش، تحقیقاتی صورت گرفته است، در سال ۲۰۱۲ تحقیقی توسط Akoglu در ترکیه بر روی ۱۴ نمونه شیر خام جمع‌آوری شده از فروشگاه‌ها انجام شد و ۹ سویه سودوموناس آئروژینوزا

(۶۴/۲٪) جداسازی کرد (۱۲). این تحقیق با هدف تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از شیر خام و نیز بررسی مقاومت چندگانه و تعیین ایزوله‌های^۱ ESBL انجام شد.

روش بررسی

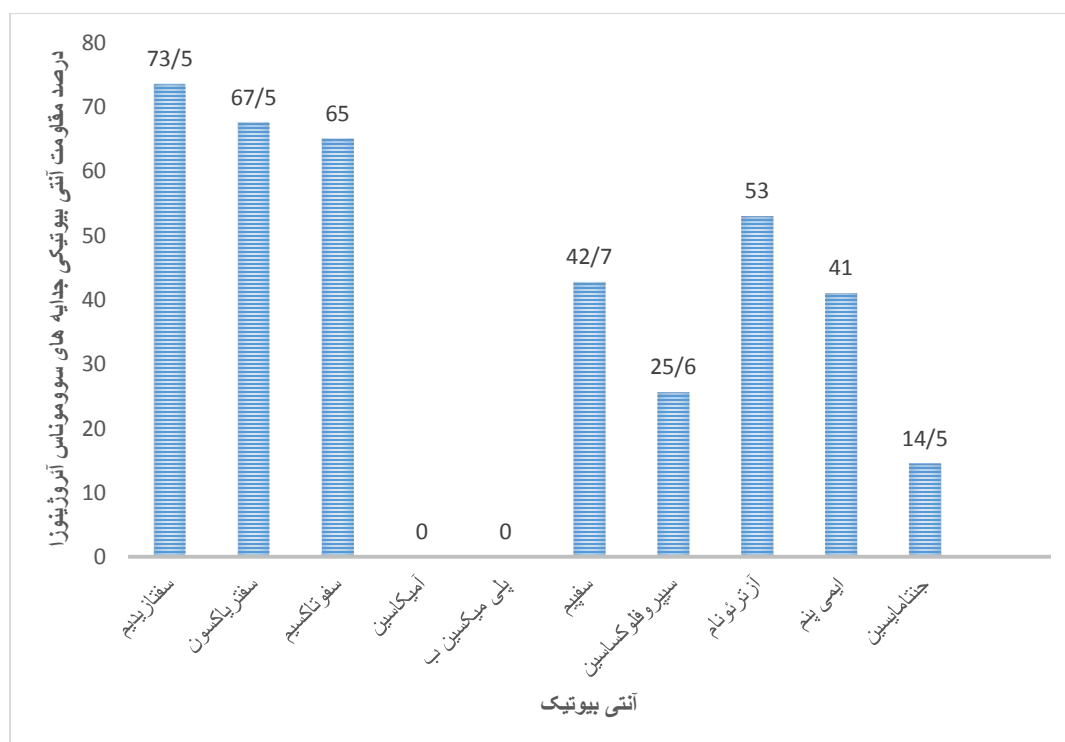
جمع‌آوری نمونه‌ها از فروردین ماه تا مرداد ماه سال ۱۳۹۴ به صورت تصادفی و از فروشگاه‌های مختلف سطح شهر قم و دامداری‌ها انجام گرفت. تمامی نمونه‌ها در شرایط استریل و داخل لوله‌های استریل درپوش‌دار و در کابین حاوی یخ به آزمایشگاه منتقل شدند. از هر نمونه شیر، یک سی سی به محیط ستریمیدآگار منتقل شد و کشت انبوه داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷°C قرار داده شد، سپس برای بررسی میکروسکوپی، از کلنی‌های رشد یافته رنگ‌آمیزی گرم انجام شد و برای تایید باکتری، تست‌های تشخیصی بیوشیمیایی شامل: آزمون اکسیداز، الگوی تخمیر TSI (تریپل شوگرآیرون آگار)، تولید رنگدانه پیوسیانین، توانایی رشد در ۴۲°C انجام شد، سپس کشت خالص از جدایه‌ها تهیه شد (۱۳، ۱۴). برای انجام آنتی‌بیوگرام به روش دیسک دیفیوژن، تعداد 1 یا 2 کلنی از کشت خالص ۲۴ ساعته به لوله آزمایش حاوی 2 میلی‌لیتر محیط تریپتیک سوی براث (مرک آلمان) منتقل و به مدت ۳-۴ ساعت در دمای ۳۷°C گرماگذاری شد. سپس ۲۰-۱۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون به لوله آزمایش حاوی 2 میلی‌لیتر محلول سالین منتقل گردید تا کدورتی مشابه کدورت استاندارد نیم مک‌فارلند به دست آید. برای انجام این کار، سوآب پنبه‌ای استریل به سوسپانسیون میکروبی با کدورت معادل کدورت استاندارد نیم مک‌فارلند، آغشته و سپس سوآب مرطوب روی سطح پلیت ۱۰ سانتی‌متری حاوی محیط مولر هیتون آگار (مرک آلمان) به ضخامت ۴ تا ۵ میلی‌متر، ۳ بار با زاویه ۳۰ درجه به صورت خطوط رفت و برگشت نزدیک به هم کشت داده شد تا بدین ترتیب درکل سطح محیط مولر هیتون آگار به صورت یکنواخت کشت داده شود. بعد از گذشت ۱۵ دقیقه پس از تلقیح سوسپانسیون میکروبی به محیط کشت، عمل دیسک گذاری انجام شد (۱۵). دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی (ساخت شرکت MAST انگلیس) مورد استفاده شامل: ایمپینم (10µg)، سفپیم (30µg)، سفنازیدیم (30µg)، سیپروفلوکساسین (5µg)، آمیکاسین (30µg)، پلی‌میکسین B (30µg)، سفتریاکسون (30µg)، آزترئونام (30µg)، جنتامایسین (10µg) و سفوتاکسیم (30µg). دیسک‌ها با پنس استریل به فاصله ۲۵ میلی‌متر از هم و ۱۵ میلی‌متر از لبه پلیت حاوی محیط مولر هیتون آگار، گذاشته شدند و سپس در دمای ۳۷°C گرماگذاری شدند. نتایج با ثبت قطر هاله عدم رشد و مقایسه با استانداردهای CLSI به دست آمد (۱۶). تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار spss انجام شد. برای تعیین ایزوله‌های ESBL، جدایه‌های مقاوم به سفنازیدیم بر اساس روش دیسک ترکیبی از نظر حضور بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف مورد بررسی قرار گرفتند. در این روش از دیسک‌های مرکب (30µg سفنازیدیم + 10µg

¹ - Extended spectrum beta-lactamase

کلولانیک اسید) و (۳۰µg سفوتاکسیم + ۱۰µg کلولانیک اسید) تهیه شده از شرکت Mast انگستان استفاده شد. دیسک‌ها در فاصله ۲۰ میلی‌متر از هم در سطح محیط مولر هینتون آگار قرار گرفتند. در صورتی که قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک‌های حاوی کلولانیک اسید، ۵ میلی‌متر یا بیشتر از دیسک سفتازیدیم باشد، تولید بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف مثبت در نظر گرفته می‌شود. برای تعیین مقاومت چندگانه (MDR)، سویه‌های مقاوم به حداقل سه کلاس آنتی‌بیوتیکی شمارش شد و به عنوان سویه‌های MDR در نظر گرفته شد (۳).

یافته‌ها

در مجموع ۱۱۷ سویه سودوموناس آئروژینوزا پس از انجام آزمون‌های استاندارد آزمایشگاهی جداسازی شد. با انجام تست آنتی‌بیوگرام، بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم (۷۳/۵ درصد) و بیشترین حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک آمیکاسین و پلی‌میکسین ب (۱۰۰٪) در بین جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا به دست آمد (نمودار شماره ۱).



نمودار ۱: الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا

از ۱۱۷ جدایه‌ی سودوموناس آئروژینوزا، ۲۷ جدایه (۲۳٪)، مقاومت دارویی چندگانه (MDR)، به سه کلاس آنتی‌بیوتیکی نشان دادند. این مقاومت‌ها، به آنتی‌بیوتیک آزترینوزام از کلاس مونوباکتام‌ها و به آنتی‌بیوتیک ایمپنم از کلاس کرباپنم‌ها و به آنتی‌بیوتیک سفنازیدیم و سفوتاکسیم از کلاس سفالوسپورین‌ها بود. از ۱۱۷ جدایه سودوموناس آئروژینوزا، ۸۶ جدایه به آنتی‌بیوتیک سفنازیدیم مقاوم بودند (۷۳/۵٪) که ۲۸ جدایه از این تعداد ESBL مثبت بودند (۳۲/۵۵٪) (شکل ۱).



شکل ۱: تایید فنوتیپی جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا مولد بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف، ۱: دیسک سفنازیدیم، ۲: دیسک ترکیبی سفنازیدیم و کلوالانیک اسید، ۳: دیسک سفوتاکسیم، ۴: دیسک ترکیبی سفوتاکسیم و کلوالانیک اسید.

بحث

سودوموناس آئروژینوزا باکتری فرصت‌طلبی است که متابولیسم قوی دارد و یکی از عوامل مهم ایجاد کننده عفونت در بیماران با سیستم ایمنی ضعیف می‌باشد (۱۷). آلودگی محصولات لبنی با سودوموناس آئروژینوزا یکی از مشکلات اساسی در صنایع لبنی می‌باشد، زیرا این باکتری با داشتن عوامل بیماری‌زای متعدد، رشد در دماهای مختلف و مقاوم بودن به اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها متداول، مشکلات متعددی را ایجاد کرده است (۱۸). در پژوهش حاضر ۱۱۷ سویه سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از محصولات لبنی مورد بررسی قرار گرفت و بیشترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به آنتی‌بیوتیک سفنازیدیم به دست آمد (۷۳/۵٪) و مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک سفتریاکسون، سیپروفلوکساسین و جنتامایسین به ترتیب ۶۷/۵٪، ۲۵/۶٪ و ۱۴/۵٪ به دست آمد. در تحقیقاتی که توسط EL-Roos در سال ۲۰۱۳ در مصر انجام گرفت، ۵۶ سویه سودوموناس آئروژینوزا، از محصولات لبنی جمع‌آوری کرد که بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین (۶۰/۷٪) بود و مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک جنتامایسین و سفتریاکسون به ترتیب ۲۱/۴

٪ و ۱۷/۹٪ بود (۱۸). در تحقیقی که در سال ۲۰۱۱ توسط Arslan در ترکیه انجام شد، از ۱۴۰ نمونه پنیر خانگی که از شیرخام تهیه شده بود، ۳۲ نمونه به باکتری سودوموناس آلوده بود که ۲ مورد از آن‌ها سودوموناس آئروژینوزا بود و با انجام تست آنتی‌بیوگرام، حساسیت جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک آمیکاسین، پلی میکسین ب و جنتامایسین ۱۰۰٪ گزارش شد (۷). در پژوهش حاضر ۲۳٪ از جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاومت MDR از خود نشان دادند، در سال ۲۰۰۷ Munsch-Alatossava در فنلاند، روی ۶۰ سویه سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از نمونه های شیرخام تحقیق کرد و گزارش کرد که ۵۲/۹٪ از جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک سفنازیدیم و ۱۹/۲٪ از جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین مقاومت نشان دادند و در مجموع ۶۰٪ از جدایه‌ها مقاومت MDR از خود نشان دادند (۱۹). در سال ۲۰۱۲ Sivaraaj در هند، از ۵۰ سویه سودوموناس آئروژینوزای جمع‌آوری شده از نمونه‌های محیطی، گزارش کرد که ۴۲٪ مقاومت MDR از خود نشان دادند (۲۰). در پژوهش حاضر از ۱۱۷ جدایه سودوموناس آئروژینوزا، ۳۸ جدایه از لحاظ تولید بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBL) مثبت بودند (۳۲/۵۵ درصد)، در ایتالیا در سال ۲۰۱۴ با بررسی ۱۱ سویه سودوموناس آئروژینوزا، گزارش کرد که ۳۶٪ از جدایه‌ها مولد ESBL هستند (۲۱). در پژوهشی که در سال ۲۰۱۵ در بنگلادش توسط Nasreen انجام شد، از ۵۲ نمونه آب رودخانه مورد بررسی ۳۲ سویه سودوموناس آئروژینوزا جدا کردند که با انجام تست آنتی‌بیوگرام، تمام این جدایه‌ها به سفنازیدیم و سفوتاکسیم مقاوم بودند و ۱۰۰٪ مولد ESBL بودند (۲۲).

نتیجه گیری

این مطالعه نشان داد که شیوع سودوموناس آئروژینوزا در شیر خام بالا است و این مطلب زنگ خطری جدی برای جلوگیری از انتشار بیشتر این میکروب می‌باشد. با توجه به فراوانی سودوموناس آئروژینوزا در مواد لبنی و به خصوص شیر، باید توجه ویژه‌ای به بهداشت و کیفیت مواد لبنی شود. از آنجا که شیر و مواد لبنی به‌علت دارا بودن ارزش غذایی بالا، در تغذیه انسان نقش به‌سزایی دارند و از طرفی محیط غذایی مناسبی برای رشد باکتری‌هایی چون سودوموناس آئروژینوزا می‌باشند، دامداری‌ها و فروشگاه‌ها باید از وضعیت کاملاً بهداشتی برخوردار باشد. شیر باید با رعایت موازین بهداشت همگانی تولید شود و در تمام مراحل تولید، جمع‌آوری و حمل‌ونقل از تماس مستقیم و غیرمستقیم با منبع آلودگی خارجی، دور نگه داشته شود و در صورت عدم رعایت استاندارد در پاکیزگی و بهداشت، عدم کاربرد مواد ضد عفونی کننده و فقدان سیستم‌های سرد کننده، تعداد باکتری‌های موجود در شیر، به بیش از چندین میلیون در هر میلی لیتر خواهد رسید.

References:

1. Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs*. 2007;67(3):351-68.
2. Kelch W, Lee J. Antibiotic resistance patterns of gram-negative bacteria isolated from environmental sources. *Applied and Environmental Microbiology*. 1978;36(3):450-6.
3. Munsch-Alatossava P, Rita H, Alatossava T. A faster and more economical alternative to the standard plate count (SPC) method for microbiological analyses of raw milks. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology Formatez, Badajoz, Spain*. 2007:495-9.
4. Boucher Y, Labbate M, Koenig JE, Stokes H. Integrons: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria. *Trends in microbiology*. 2009;17(11):505-12.
5. Strateva T, Markova B, Ivanova D, Mitov I. Distribution of the type III effector proteins-encoding genes among nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Bulgaria. *Annals of microbiology*. 2010;60(3):503-9.
6. 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. *Iranian Journal of Medical Microbiology*. 2014;8(4):36-43. [Full Text in Persian]
7. Arslan S, Eyi A, Özdemir F. Spoilage potentials and antimicrobial resistance of *Pseudomonas* spp. isolated from cheeses. *Journal of dairy science*. 2011;94(12):5851-6.
8. Hantsis-Zacharov E, Halpern M. Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. *Applied and environmental microbiology*. 2007;73(22):7162-8.
9. Skean J, Overcast W. Changes in the paper electrophoretic protein patterns of refrigerated skim milk accompanying growth of three *Pseudomonas* species. *Applied microbiology*. 1960;8(6):335-8.

- .۱۰ Singh P, Wani AA, Karim A, LANGOWSKI HC. The use of carbon dioxide in the processing and packaging of milk and dairy products: a review. *International journal of dairy technology*. 2012;65(2):161-77.
- .۱۱ Ogier J-C, Lafarge V, Girard V, Rault A, Maladen V, Gruss A, et al. Molecular fingerprinting of dairy microbial ecosystems by use of temporal temperature and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004;70(9):5628-43.
- .۱۲ Akoglu A, Altuntas EG, Yemis GP. A modified selective medium containing benzalkonium chloride (BKC) for the isolation of *Pseudomonas aeruginosa* from raw milk. *Food and Nutrition Sciences*. 2012;3(7):947.
- .۱۳ Peymani A, Farivar TN, Rahimi H, Ranjbar M, Najafipour R. Frequency of Class I Integron among Multidrug Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from the Selected Hospitals in Qazvin and Tehran, Iran. *Qom University of Medical Sciences Journal*. 2014;8 [Full Text in Persian].
- .۱۴ Hall G. Nonfermenting and miscellaneous Gram negative bacilli. Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G: *Textbook of diagnostic microbiology*, 3th ed Ohio: Saunders-Elsevier. 2007:564-84.
- .۱۵ Henwood CJ, Livermore DM, James D, Warner M, Group PS. Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*: results of a UK survey and evaluation of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy disc susceptibility test. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2001;47(6):789-99.
- .۱۶ Aghaei SS, Javadi A, Morovvati A, Sharifi Y. DETECTION OF EXOTOXIN (A, Y, T ,U, S) GENES OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* WITH MULTIPLEX PCR. *Iranian Journal of Public Health*. 2014;43(2):228. [Full Text in Persian]
- .۱۷ Corona-Nakamura AL, Miranda-Navales MaG, Leaños-Miranda B, Portillo-Gómez L, Hernández-Chávez A, Anthon-Rendón J, et al. Epidemiologic study of *Pseudomonas aeruginosa* in critical patients and reservoirs. *Archives of medical research*. 2001;32(3):238-42.
- .۱۸ EL-ROOS NAA, MAZID EM, ZAKARY EM, EL YAZID KFA. MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ISOLATED FROM MILK. *Assiut Vet Med J*. 20۰۹;(۱۳۹)۵۹;۱۳
- .۱۹ Munsch-Alatossava P, Alatossava T. Antibiotic resistance of raw-milk-associated psychrotrophic bacteria. *Microbiological research*. 2007;162(2):115-23.

.۲۰ Sivaraj S, Murugesan P, Muthuvelu S, Purusothaman S, Silambarasan A. Comparative study of *Pseudomonas aeruginosa* isolate recovered from clinical and environmental samples against antibiotics. *Int J Pharm PharmSci*. 2012;4:103-7.

.۲۱ Stefani S, Giovanelli I, Anacarso I, Condò C, Messi P, de Niederhäusern S, et al. Prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in food-producing animals in Northern Italy. *New Microbiologica*. 2014;37:551-5.

.۲۲ Nasreen M, Sarker A, Malek M, Ansaruzzaman M, Rahman M. Prevalence and Resistance Pattern of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Surface Water. *Advances in Microbiology*. 2015;5(01):74.