

فراوانی ژنوتیپ‌های بتالاکتاماز طیف گسترده CTX-M در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزای جداشده از بیمارستان‌های کرمانشاه (93-1392)

عرفان حیدری

گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی،

واحد سنندج، سنندج، ایران

علی‌شا اکیا*

گروه میکروپزشکی، مرکز تحقیقات

عفونت‌های بیمارستانی، دانشگاه علوم پزشکی

کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

*عهدہ دار مکاتبات: کرمانشاه، بلوار شهید

شیرودی، خیابان دانشگاه، دانشکده پزشکی،

گروه میکروپزشکی، کد پستی 6714869914

تلفن: 083-34274618

Email: akya359@yahoo.com

دریافت: 1393/11/30

پذیرش: 1394/4/30

زمینه: سودوموناس آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) یکی از عوامل مهم عفونت‌های فرصت طلب است. عفونت ایجادشده به وسیله سودوموناس آئروژینوزا اغلب شدید و تهدیدکننده بوده و درمان آن به دلیل حساسیت محدود به عوامل ضد میکروبی و کسب مقاومت در حین درمان، مشکل است. هدف از مطالعه حاضر، تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فراوانی ژن‌های بتالاکتاماز طیف گسترده CTX-M در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزای جداشده از بیمارستان‌های کرمانشاه در سال 1392-93 بود.

روش‌ها: تعداد 60 ایزوله سودوموناس آئروژینوزا از نمونه‌های سوختگی، ادرار، ترشحات ریه و دیگر نمونه‌ها از بیمارستان‌های بزرگ شهر کرمانشاه جدا شد. مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها طبق استاندارد CLSI و با روش دیسک دیفیوژن تعیین شد. وجود ژن‌های CTX-M با PCR مشخص و داده‌های حاصل از نظر آماری تحلیل شد.

یافته‌ها: در این مطالعه بیشترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به کاربنی‌سیلین و کم‌ترین میزان نسبت به جنتامیسین بود. نتایج به دست آمده از PCR نشان داد که به ترتیب 13 ایزوله (21/6%) دارای ژن CTX-M، 3 ایزوله (5%) دارای ژن CTX-M₁، 2 ایزوله (3/3%) دارای ژن CTX-M₂ و 3 ایزوله (5%) دارای ژن CTX-M₃ هستند.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه بیانگر درصد مقاومت بالای آنتی‌بیوتیکی در میان ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد. از طرفی شیوع ژن‌های CTX-M در میان ایزوله‌ها، به ویژه ایزوله‌های ناشی از زخم سوختگی در کرمانشاه بالا است و می‌تواند به گسترش مقاومت در این باکتری منجر شود.

کلیدواژه‌ها: سودوموناس آئروژینوزا، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، بتالاکتاماز، CTX-M

The frequency of broad-spectrum beta-lactamase CTX-M genotypes in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Kermanshah hospitals (2013-14)

Background: *Pseudomonas aeruginosa* is one of the most important causes of opportunistic infections. The infection caused by *P. aeruginosa* is usually severe and life-threatening and its treatment is difficult due to limited susceptibility to antimicrobial agents and acquiring resistance during treatment. The purpose of this study was to determine the prevalence of antibiotic resistance and extended spectrum of beta lactamase (ESBL) genes of CTX-M in the *P. aeruginosa* isolated from Kermanshah hospitals in 2013-2014. **Methods:** A total of 60 isolates of *P. aeruginosa* were collected from burn wound, urine, lung and other samples from major hospitals of Kermanshah. The antimicrobial susceptibility of isolates was determined using disk diffusion method according to CLSI standards. The CTX-M genes were detected by PCR and the collected data were statistically analyzed.

Results: In this study, the highest and lowest rates of antibiotic resistance were reported for carbenicillin and gentamicin, respectively. The PCR results showed 13 (21.6%), 3 (5%), 2 (3.3%) and 3 (5%) isolates contained CTX-M, CTX-M₁, CTX-M₂ and CTX-M₃ genes, respectively.

Conclusion: The results of this study indicated a high antibiotic resistant rate among *P. aeruginosa* isolates. Moreover, the frequency of CTX-M genes among isolates, in particular the burn wound isolates, is high in Kermanshah and can result in the expansion of resistance in this bacterium.

KeyWords: *Pseudomonas aeruginosa*, betalactamase, CTX-M, antibiotic resistance

Erfan Haidari

Dept. of Microbiology, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran.

Alisha Akya*

Dept. of Medical Microbiology, Nosocomial Infection Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.

*Corresponding author:

Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Daneshgah St., Shirudi Boulevard, Kermanshah, Iran. Postal code: 6714869914

Tel: +98 83 34274618

Email: akya359@yahoo.com

Received: 18 February, 2015

Accepted: 21 July, 2015

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) یکی از مهم‌ترین باسیل‌های گرم منفی بیماری‌زای فرصت‌طلب است. عفونت‌های ایجادشده به‌وسیله سودوموناس آئروژینوزا اغلب شدید و تهدیدکننده است و درمان آن‌ها به‌دلیل حساسیت محدود به عوامل ضد میکروبی و ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در حین درمان مشکل است (1 و 2). مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های مولد عفونت‌های بیمارستانی به‌عنوان یک مشکل جدی در بخش سلامت کشور مطرح است و بیماران زیادی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. به‌دلیل اهمیت مقاومت آنتی‌بیوتیکی در درمان بیماری‌های عفونی، سازمان جهانی بهداشت سال 2011 را به‌عنوان سال مقاومت آنتی‌بیوتیکی نام‌گذاری کرد (3 و 4). آنتی‌بیوتیک‌هایی که برای درمان عفونت سودوموناسی به‌کار می‌روند شامل پنی‌سیلین‌های طیف گسترده، مانند کاربنی‌سیلین (carbenicilin)، تیکارسیلین (ticarcilin) و پپراسیلین (piperacilin) و سفالوسپورین‌های طیف گسترده مانند سفتازیدیم (ceftazidime) و سفپایم (cefepime)، کارباپنم‌ها (carbapenems)، آمینوگلیکوزیدها (aminoglycosides)، فلوروکینولون‌ها (fluoroquinolons) و آزترئونام (aztreonam) هستند؛ اما ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزایی که به این عوامل مقاومت نشان می‌دهند در حال افزایش است (5 و 6).

در بین مقاومت‌های دارویی، مقاومت نسبت به بتالاکتام‌ها (lactams -) نگرانی جدی در زمینه درمان عفونت‌های باکتریایی به‌وجود آورده است. مهم‌ترین مکانیسم مقاومت در برابر این آنتی‌بیوتیک‌ها، تولید آنزیم بتالاکتاماز است که باعث هیدرولیز و غیرفعال شدن بتالاکتام‌ها می‌شود. بتالاکتامازهای طیف گسترده (Extended-Spectrum- Lactamases) که توسط باکتری‌های گرم منفی تولید می‌شوند، از نظر مولکولی در کلاس A طبقه‌بندی آمبلر (Ambler) و از نظر عملکردی در گروه دوم طبقه‌بندی بوش (Bush- Jocoby- Medeiros)

قرار می‌گیرند (7).

بتالاکتامازهای طیف گسترده CTX-M، معمولاً توسط پلاسמיד کد می‌شوند. این آنزیم‌ها توانایی هیدرولیز سفالوسپورین‌های طیف گسترده را داشته و توسط کلاولانیک اسید و تازوباکتام مهار می‌شوند (8). این آنزیم‌ها بر اساس تغییرات توالی آمینواسیدی به پنج گروه اصلی تقسیم می‌شوند (7). منشأ برخی از این آنزیم‌ها، ژن‌های کروموزومی باکتری *Kluyvera spp.* بوده که از طریق پلاسמידهای کونزوگ به باکتری‌های پاتوژن دیگر منتقل شده است (7). تاکنون بیش از 50 نوع CTX-M شناسایی شده است (9). با توجه به مقاومت روزافزون ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا و لزوم بررسی دقیق آن‌ها از نظر ژنوتیپی و اهمیت اپیدمیولوژی پایش ژن‌های مقاومت و با توجه به این‌که هنوز در کرمانشاه مطالعه‌ای در مورد فراوانی ژنوتیپ‌های CTX-M در این باکتری انجام نشده است، این تحقیق جهت تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فراوانی ژنوتیپ‌های CTX-M ایزوله‌های جداشده از بیماران در کرمانشاه پرداخت.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق تعداد 60 ایزوله سودوموناس آئروژینوزا از انواع نمونه‌های بالینی بیمارستان‌های شهر کرمانشاه در سال 93-1392 شامل بیمارستان امام خمینی، بیمارستان امام رضا و بیمارستان طالقانی جدا شد. پس از انجام تست‌های تشخیصی افتراقی از جمله تست‌های کاتالاز، اکسیداز، خصوصیات رشد در محیط TSI، تولید SH₂ و گاز، تولید رنگدانه، ایندول و متیل رد همچنین داشتن حرکت در محیط SIM و رشد در 42 درجه سانتی‌گراد در محیط ستریمید آگار، تعیین جنس و گونه شدند.

میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا طبق استاندارد 2013 CLSI (10) با روش دیسک دیفیوژن و با استفاده از دیسک‌های MAST

استفاده شد. روش PCR برای شناسایی ژنهای CTX-M، CTX-M₁، CTX-M₂ و CTX-M₃ با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و حجم نهایی 25 µl شامل Master mix 2X (سیناکلون، ایران)، DNA باکتری، پرایمر 10 پیکومول (سیناکلون، ایران) و آب مقطر استریل انجام شد. توالی پرایمرها و اندازه محصول واکنش PCR بیان شده است (جدول 1). محصولات PCR به همراه مارکر 100 base pair در ژل آگارز 1 درصد الکتروفورز شد. ژل توسط اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی گردید. سپس به وسیله دستگاه Gel Doc (BioRad, USA) از آن عکس گرفته شد. در پایان داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS 18 و آزمون مجذور کای از نظر آماری بررسی شد.

(England, Merseyside) که شامل پیراسیلین (100 µg)، کاربنیسیلین (100 µg)، سفنازیدیم (30 µg)، سفپایم (30 µg)، ایمی پنم (10 µg)، مروپنم (10 µg)، جتتامیسین (10 µg)، آمیکاسین (30 µg)، تویراماسین (10 µg)، نتیل میسین (30 µg)، سیپروفلوکساسین (5 µg)، لووفلوکساسین (5 µg) و آزترئونام (30 µg) بود، انجام شد. سویه های با مقاومت چنددارویی (MDR= Multidrug-resistant) برای ایزوله هایی که به سه کلاس آنتی بیوتیکی و یا بیشتر مقاومت داشتند تعریف شد و عدم حساسیت (مقاومت) شامل ایزوله هایی بود که به آنتی بیوتیک ها مقاومت و یا حالت بینابینی (intermediate) داشتند. جهت انجام PCR، از DNA ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا که به روش جوشاندن استخراج شده بود،

جدول 1- توالی پرایمرهای مورد استفاده و اندازه محصول برای ژنهای CTX-M

Primer	Sequence	Amplicon size (base pair)	Ref.
CTX-M-F	5'-ACGCTGTTGTTAGGAAGTG-3'	759	11
CTX-M-R	5'-TTGAGGCTGGGTGAAGT-3'		
CTX-M ₁ -F	5'-CGTCACGCTGTTGTTAGGAA-3'	780	12
CTX-M ₁ -R	5'-ACGGCTTTCTGCCTTAGGTT-3'		
CTX-M ₂ -F	5'-CGGAATTCATGATGACTCAGAGCATTCG-3'	605	13
CTX-M ₂ -R	5'-GCTCTAGATTATTGCATCAGAAACCGTG-3'		
CTX-M ₃ -F	5'-AATCACTGCGCCAGTTCACGCT-3'	540-600	14
CTX-M ₃ -R	5'-GAACGTTTCGTCTCCCAGCTGT-3'		

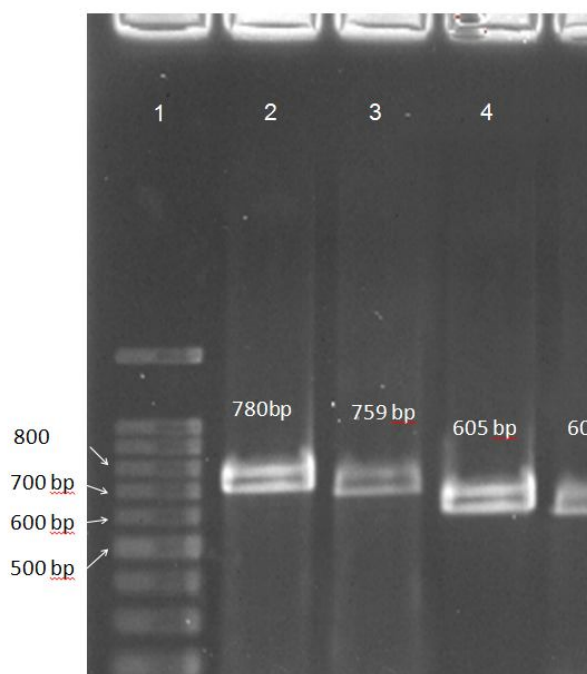
یافته ها

از مجموع 60 ایزوله جدا شده، 32 (53/3٪) ایزوله از نمونه سوختگی، 9 (15٪) ایزوله از نمونه ادرار، 10 (16/6٪) ایزوله از نمونه ریه و 9 (15٪) ایزوله از دیگر نمونه ها بود. در این مطالعه 42 (70٪) ایزوله MDR بودند که در این بین 25 (59/5٪) ایزوله از نمونه سوختگی، 5 (11/9٪) ایزوله از نمونه ادرار، 6 (14/2٪) ایزوله از نمونه ریه، 2 (4/7٪) ایزوله از نمونه خون، 2 (4/7٪) ایزوله از نمونه زخم، 1 (2/4٪) ایزوله از نمونه کاتتر و 1 (2/4٪) ایزوله از نمونه واژینال بود (نمودار 1 و جدول

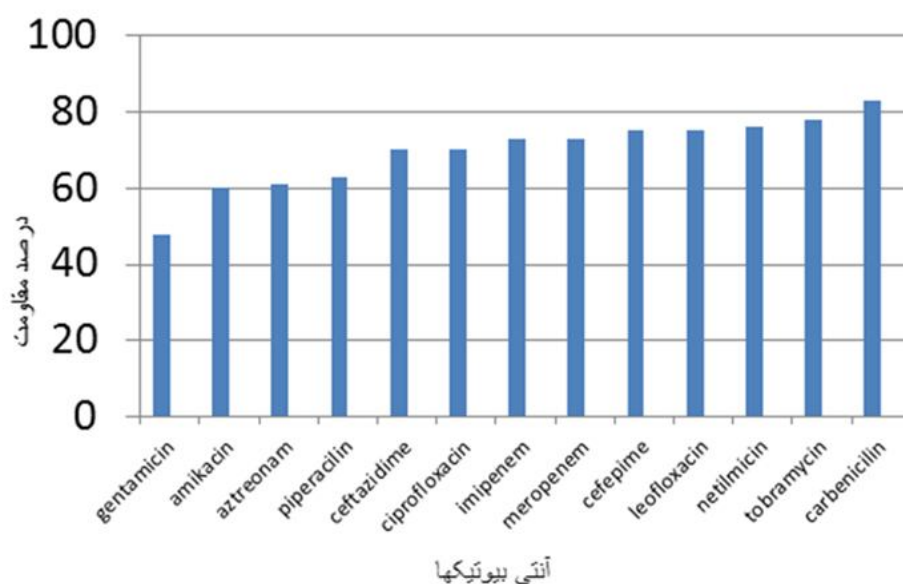
از 60 ایزوله سودوموناس آئروژینوزای مورد بررسی، 47 (78/3٪) ایزوله مربوط به بیمارستان امام خمینی، 11 (18/3٪) ایزوله مربوط به بیمارستان امام رضا و 2 (3/3٪) ایزوله مربوط به بیمارستان طالقانی بودند. از 60 نمونه مورد مطالعه 31 نمونه مربوط به مردان و 29 نمونه مربوط به زنان بود. میانگین سنی بیماران مرد 31/6±23/9 بود. میانگین سنی بیماران زن 28/6±19/9 و حداکثر سن 76 سال و حداقل 2 ماه بود.

ایمی‌پنم، مروپنم و آرترونام به ترتیب 61، 69، 76، 76، 69، 69 و 61 درصد بود. همچنین 3 ایزوله (5٪) دارای ژن CTX-M₁، 2 ایزوله (3/3٪) دارای ژن CTX-M₂ و 3 ایزوله (5٪) دارای ژن CTX-M₃ بودند (شکل 1).

2. از نتایج به دست آمده از روش PCR نشان داد که 13 ایزوله (21/6٪) دارای ژن CTX-M هستند که در این گروه مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتاماز از جمله پیراسیلین، کاربنی‌سیلین، سفنازیدیم، سفپایم،



شکل 1- الکتروفورز محصولات PCR در ژل آگارز 1٪: 1. DNA Ladder 100 base pair، 2. نمونه مثبت ژن CTX-M₁، 3. نمونه مثبت ژن CTX-M، 4. نمونه مثبت ژن CTX-M₂، 5. نمونه مثبت ژن CTX-M₃، 6. کنترل منفی.



نمودار 1- درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا

جدول 2- مقایسه درصد عدم حساسیت ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا به آنتی‌بیوتیک‌ها در نمونه‌های مختلف

نوع نمونه	آزیترومایسین	مروپنم	آنتی‌بیوتیک	سفتازیدیم	کاربنی‌سیلین	پیپراسیلین	آمیکاسین	آ. سیلین	سفتازیدیم	پیپراسیلین	آزیترومایسین	سپروفلوکساسین	لورفلوکساسین
سوختگی	81/2	75	78/1	90/6	84/4	96/8	78/1	56/2	84/3	78/1	81/2	81/2	81/2
ادار	33/3	77/7	77/7	44/4	33/3	88/8	44/4	22/2	66/6	77/7	55/5	66/6	66/6
ریه	30	70	70	60	60	50	40	30	40	60	50	70	70
دیگر نمونه‌ها	55/5	66/6	55/5	66/7	66/7	66/6	55/6	55/5	88/8	88/8	66/6	66/6	66/6
کل	61/7	73/3	73/3	75	70	83/3	63/3	60	48/3	78/3	76/6	70	75
P value	0/03	0/9	0/7	0/01	0/02	0/003	0/7	0/04	0/5	0/2	0/5	0/1	0/4

بحث

نتایج پژوهش‌ها نشان داده که بین مصرف داروهای ضد سودوموناسی (آمیکاسین، سپروفلوکساسین، سفتازیدیم و ایمپنم) و گسترش سویه‌های سودوموناس آئروژینوزای MDR رابطه معناداری وجود داشته است (15). درصد عدم حساسیت ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا در مطالعه حاضر برای همه آنتی‌بیوتیک‌ها به‌جز جنتامیسین بالای 50 درصد بود. همچنین در این مطالعه فراوانی سودوموناس آئروژینوزای MDR بالا بود که البته با نتایج مطالعات دیگر همخوانی دارد. به‌طوری‌که میزان MDR در ایزوله‌های بیماران سوختگی در ایران 87/05 درصد، در مالزی 68/8 درصد و در عفونت‌های زخم سوختگی در پاکستان 29/24 درصد گزارش شده است (16-18). در مطالعه ما بیشترین شیوع ایزوله‌های MDR در بین نمونه‌های سوختگی بود که این خود نشان اهمیت سودوموناس آئروژینوزای مقاوم به دارو در ایجاد عفونت زخم‌های سوختگی است (19). در نتایج تحقیق حاضر، ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاومت بالایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام نشان دادند. به‌طوری‌که بیشترین میزان مقاومت نسبت به کاربونی‌سیلین و در ایزوله‌های جداشده از نمونه سوختگی بود که در نتیجه درمان عفونت‌های سودوموناسی را با

مشکل مواجه می‌کند. همچنین ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا در این تحقیق مقاومت بالایی به کاربامپنم‌ها و سفالوسپورین‌های نسل سوم و چهارم نشان دادند که نسبت به مطالعات قبلی که در ایران انجام شده روند افزایشی داشته است و این پدیده می‌تواند تهدید مهمی در درمان عفونت‌های بیمارستانی باشد. چنان‌که در مطالعه‌ای که در سال 1389 در کاشان انجام شد، میزان مقاومت به ایمپنم، سفتازیدیم و آزترئونام به‌ترتیب 29، 21 و 19 درصد بود (13). مطالعه دیگری در اصفهان در سال 1391 میزان مقاومت نسبت به ایمپنم، سفپایم، سفتازیدیم و پیپراسیلین را به‌ترتیب 55، 55، 57 و 48 درصد گزارش کرد (20). همچنین در مطالعه‌ای در سال 1391 در بیمارستان سوانح سوختگی یزد، میزان مقاومت ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ایمپنم، مروپنم، سفپایم و پیپراسیلین به‌ترتیب 74، 66، 62 و 70 درصد بود (21). در مطالعه دیگری در اراک در سال 1392 میزان مقاومت نسبت به سفتازیدیم 33/3، ایمپنم 22/2، مروپنم 24، آمیکاسین 20/3، سپروفلوکساسین 15/7 و جنتامیسین 19/4 درصد گزارش شد (22). همه این نتایج از میزان مقاومت ایزوله‌ها در مطالعه حاضر پایین‌تر می‌باشند که احتمالاً مصرف بی‌رویه و تجویز نابجای آنتی‌بیوتیک‌ها در

برابر نتایج مطالعه ما است (26). این اختلاف ممکن است به دلیل نوع نمونه مورد مطالعه در شیراز باشد که اکثراً (82/6٪) از نمونه‌های سوختگی بوده است؛ اما در مطالعه ما حدود نیمی از ایزوله‌ها از نمونه‌های سوختگی بود. در کشورهای دیگر نیز نتایج مختلفی برای شیوع ESBL به دست آمده است. مثلاً در مطالعه‌ای که در برزیل در سال 2012 میلادی انجام شد، CTX-M2 بیشترین شیوع (19/6٪) را در بین آنزیم‌های ESBL داشته است (27). در مطالعاتی که در فرانسه و ژاپن در سال‌های 2010 و 2003 میلادی انجام شد، فراوانی آنزیم CTX-M را در سودوموناس آئروژینوزا صفر درصد گزارش گردید که احتمالاً به دلیل مصرف مناسب و بجای آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام به خصوص سفالوسپورین‌ها در این کشورها است (28 و 29). مطالعه‌ای که در هند در سال 2014 میلادی انجام شد، فراوانی CTX-M₁ را در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا 6/3 درصد گزارش کرد که به نتیجه مطالعه حاضر نزدیک است (30).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه بیانگر درصد مقاومت بالای آنتی‌بیوتیکی در میان ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد. از طرفی گسترش ژن‌های CTX-M در میان ایزوله‌ها، به‌ویژه ایزوله‌های ناشی از زخم سوختگی، در کرمانشاه هشداردهنده است و می‌تواند به گسترش مقاومت در این باکتری منجر شود.

سال‌های اخیر یکی از دلایل افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این باکتری بوده است. سودوموناس آئروژینوزا به سبب ماهیت ژنتیکی، پذیرنده انواع ژن‌ها از طریق پلاسمید و ترانسپوزون‌ها است، شاید به همین دلیل این باکتری می‌تواند به سرعت نسبت به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم شود (23).

در طی بررسی‌هایی که در سال‌های اخیر در ایران انجام شده، شیوع آنزیم‌های ESBL به خصوص CTX-M افزایش پیدا کرده است. فراوانی آنزیم بتالاکتاماز CTX-M در مطالعه کنونی 21/6 درصد بود که این خود می‌تواند توجیهی برای مقاومت بالای ایزوله‌ها نسبت به سفالوسپورین‌های نسل سوم و چهارم باشد. مطالعات دیگری که در ایران انجام شده است، نتایج مختلفی برای فراوانی CTX-M گزارش کرده‌اند. چنانکه مطالعه‌ای که در سال 1389 در کرمان انجام شده، فراوانی CTX-M را 2/4 درصد گزارش کرده است (24). در این تحقیق درصد شیوع ژن‌های CTX-M₁ و CTX-M₃ برابر و هر دو 5 درصد بود. همچنین در مطالعه‌ای در شهر کاشان، فراوانی CTX-M₁ 1 درصد و فراوانی CTX-M₂ و CTX-M₃ را صفر درصد گزارش کرد (13). در مطالعه دیگری در ایران 1/04 درصد از سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا مولد CTX-M بودند (25)؛ اما در مطالعه‌ای که در شیراز انجام شده، درصد فراوانی CTX-M₁، CTX-M₂ و CTX-M₃ به ترتیب برابر 49/9، 35/1 و 23/1 درصد گزارش شد. این میزان شیوع CTX-M₁ تقریباً ده

References

1. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections. Am J Infect Control. 1988;16(3):128-40.
2. Aloush V, Navon-Venezia S, Seigman-Igra Y, Cabili S, Carmeli Y. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and clinical impact. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50(1):43-8.
3. Lye DC, Kwa AL, Chlebicki P. World Health Day 2011: Antimicrobial resistance and practical solutions. Ann Acad Med Singapore. 2011;40(4):156-7.
4. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla NDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumonia* sequence type 14 from India. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53(12):5046-54.
5. Hosseini-Jazani N, Omrani MD, Yekta Z, Nejadrahim R, Afshar Yavari Sh, Zartoshti M. [Plasmid profile of *Pseudomonas aeruginosa* and its relation with antibiotic resistance in hospital isolates (Persian)]. Journal of Kerman University of Medical Sciences. 2008; 15(1):9-17.
6. Coyle MB. Manual of antimicrobial susceptibility testing. American Society for Microbiology. 2005: 168-77.

7. Falagas ME, Karageorgopoulos DE. Extended-spectrum β -lactamase-producing organisms. *J Hosp Infect.* 2009;73(4):345-54.
8. Tzouveleakis LS, Tzelepi E, Tassios PT, Legakis NJ. CTX-M-type beta-lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. *Int J Antimicrob Agents.* 2000;14(2):137-42.
9. Mirzaee M, Pourmand MR, Chitsaz M, Mansouri S. [Antibiotic resistance to third generation cephalosporins due to CTX-M-Type extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli* (Persian)]. *Iranian Journal of Public Health.* 2009;38(1):10-7.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance of Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twelfth Informational Supplement. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002: 22.
11. Ramazanzadeh R. Etiologic agents and extended-spectrum beta-lactamase production in urinary tract infections in Sanandaj, Iran. *Eastern Journal of Medicine.* 2010;15:57-62.
12. Jungmin K, Yu-Me L. Prevalence of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of Enterobacteriaceae in Korea. *J Bacteriol Viro.* 2004;34(4):303-10.
13. Tavajjohi Z, Moniri R, Khorshidi A, Rohani M. [Detection of the bla Genes (TEM-1, SHV-1, SHV-5, CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-3, CTX-M-9, OXA-1, GES-1 and GES-2) in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical and environmental samples of Shahid Beheshti Hospital in Kashan (Persian)]. *The Scientific Journal of Zanjan.* 2012;20(82):42-51.
14. Malini A, Sageerabanoo S, Kowsalya R, Gautam S. The occurrence of CTX-M3 type extended spectrum Beta Lactamases among *Escherichia Coli* causing urinary tract infections in a Tertiary Care Hospital in Puducherry. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 2012; 6(7):1203-1206.
15. Das Neves MT, de Lorenzo ME, Almeida RA, Fotalaza CM. Antimicrobial use and incidence of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a teaching hospital: An ecological approach. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2010;43(6):629-32.
16. Lim KT, Yasin RM, Yeo CC, Puthucherry SD, Balan G, Maning N, et al. Genetic fingerprinting and antimicrobial susceptibility profiles of *Pseudomonas aeruginosa* hospital isolates in Malaysia. *J Microbiol Immunol Infect.* 2009;42(3):197-209.
17. Mirsalehian A, Feizabadi M, Nakhjavani FA, Jabalameli F, Goli H, Kalantari N. Detection of VEB-1, OXA-10 and PER-1 genotypes in extended spectrum beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients. *Burns.* 2010;36(1):70-4.
18. Ullah F, Malik SA, Ahmed J. Antimicrobial susceptibility and ESBL prevalence in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in the North West of Pakistan. *Burns.* 2009;35(7):1020-25.
19. Tredget EE, Shankowsky HA, Rennie R, Burrell RE, Logsetty S. *Pseudomonas* infections in the thermally injured patient. *Burns.* 2004;30(1):3-26.
20. Ahadi A, Sharif Zadeh A, Golshani Z. [Identification of antibiotic resistance patterns of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients admitted with multiple resistances (Persian)]. *Journal of Veterinary Laboratory Research.* 2012;4(1):119-22.
21. AkhavanT, Zandi H, Vakli M, Mousavi S, Zarei M. [Frequency of β -lactamase and metallo- β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn wounds in Yazd burn hospital during 2011-2012 (Persian)]. *Journal of Kashan University of Medical Sciences Journal (FEYZ).* 2014;18(2):167-74.
22. Taghvaei R, Shojapour M, Sadeghi A, Pourbabaie A. [The study of antibiotic resistance pattern and the frequency of Extended spectrum beta-lactamases (ESBL) in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from medical centers in Arak city, Iran (Persian)]. *Qom University of Medical Sciences Journal.* 2013;7(4):36-41.
23. Pitout JD, Gregson DB, Poirel L, McClure JA, Le P, Church DL. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo beta lactamases in a large centralized laboratory. *J Clin Microbiol.* 2005;43(7):3129-35.
24. Shacheraghi F, Shakibaie MR, Noveiri H. Molecular identification of ESBL genes blaGES-1, blaVEB-1, blaCTX-M blaOXA-1, blaOXA-4, blaOXA-10 and blaPER-1 in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients by PCR, RFLP and sequencing techniques. *Intentional journal of Biological Sciences* 2010; 6(3):138-42.
25. Farshadzadeh Z, Khosravi A, Alavi S, Parhizgari N, Hoveizavi H. Spread of extended-spectrum β -lactamase genes of blaOXA-10, blaPER-1 and blaCTX-M in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients. *Burns.* 2014; 40(8):1575-80.
26. Kownani M, Baserisalehi M, Bahador N. [Frequency of extended spectrum β -Lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Shiraz hospitals, Iran (Persian)]. *Journal of Isfahan Medical School.* 2013; 31(234):1007-1017.
27. Polotto M, Casella T, de Lucca Oliveira MG, R  bio FG, Nogueira ML, de Almeida MT, et al. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* harboring blaCTX-M-2, blaGES-1and blaGES-5, bla IMP-1 and blaSPM-1 causing infections in Brazilian tertiary-care hospitals. *BMC Infect Dis.* 2012;12:176.

28. Naas T, Cuzon G, Truong H, Bernabeu S, Nordmann P. Evaluation of a DNA microarray, the check-points ESBL/KPC array, for rapid detection of TEM, SHV, and CTX-M extended-spectrum- β -lactamases and KPC carbapenemases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(8):3086-92.
29. Yamasaki K, Komatsu M, Yamashita T, Shimakawa K, Ura T, Nishio H, et al. Production of CTX-M-3 extended-spectrum β -lactamase and IMP-1 metallo β -lactamase by five Gram-negative bacilli: survey of clinical isolates from seven laboratories collected in 1998 and 2000, in the Kinki region of Japan. *J Antimicrob Chemother*. 2003;51(3):631-8.
30. Chaudhary M, Payasi A. Molecular characterization and In vitro susceptibilities of β -lactamase producing *Escherichia coli*, *Klebsiella* species, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* to CSE1034 and other β -lactams. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2014;7:217-23.