Avicenna Journal of Clinical Medicine No 95, Volume 27, Issue 1, Spring 2020, Pages: 21-29

Original Article

doi: 10.29252/ajcm.27.1.21

Frequency of Metallo-β-Lactamases and Carbapenemase Enzymes in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*

Masoumeh Beig[1], Mohammad Taheri[2], Mohammad Reza Arabestani[3,*]

[1] *MSc in Microbiology, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran*
[2] *Assistant Professor, Department of Microbiology, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran*
[3] *Associate Professor, Nutrition Health Research Center, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran*

**** Corresponding Author:** Mohammad Reza Arabestani, Nutrition Health Research Center, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran. Email: mohammad.arabestani@gmail.com*

Received: 20.12.2019
Accepted: 14.04.2020

How to Cite this Article:
Beig M, Taheri M, Arabestani MR. Frequency of Metallo-β-Lactamases and Carbapenemase Enzymes in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Avicenna J Clin Med*. 2020; 27(1): 21-29. DOI: 10.29252/ajcm.27.1.21

Abstract

Background and Objective: Due to the increased prevalence of antibiotic resistance to beta-lactam and carbapenem compounds, the identification of beta-lactamase-producing enzymes is essential for the timely treatment of such isolates. In this regard, the present study aimed to determine the prevalence of *metallo-β-lactamases* and *Klebsiella pneumonia* carbapenemase genes among the clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*).

Materials and Methods: In this cross-sectional descriptive study, a total of 97 clinical isolates were collected from the hospitalized patients of Hamadan hospitals, Hamadan, Iran, within November 2017 to May 2018. After the confirmation of the isolated strains, antibiotic susceptibility of the isolates was determined by disk diffusion agar. Minimum inhibitory concentration (MIC) was performed for imipenem using the Etest method, Combined Double-Disk Test (CDDT), and Modified Hodge test (MHT). In addition, the identification of carbapenemase genes was conducted by polymerase chain reaction (PCR).

Results: The obtained results of statistical analysis showed that the highest antibiotic resistance was reported to cefoxitin for 92 (94.8%) isolates, and the lowest antibiotic resistance was observed to piperacillin-tazobactam in 38 (39.2%) isolates. Among the carbapenem antibiotics, the highest antibiotic resistance was reported to imipenem for 48 (49.4%) isolates. Out of 49 (50.51%) carbapenem-resistant isolates, 42 (85.71%) isolates had positive results for MIC. Moreover, 26 (53.06%) and 25 (51.02%) isolates had positive results for IMP/EDTA (CDDT) and MHT test, respectively. The findings of PCR also showed that the highest and lowest gene presence among resistant isolates was related to *IMP* 20 (40.8%) and *GIM* gene 6 (12.24%), respectively.

Conclusion: The obtained results of the present study showed that a high percentage of the assessed *P. aeruginosa* isolates were resistant to carbapenem antibiotics, and a high percentage of carbapenem-resistant isolates produced beta-lactamase genes.

Keywords: Carbapenemase, Metallo-β-Lactamases, *Pseudomonas aeruginosa*

Copyright © 2020 Avicenna Journal of Clinical Medicine

مقاله پژوهشی

doi: 10.29252/ajcm.27.1.21

ارزیابی فراوانی آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز و کارباپنماز در ایزوله‌های کلینیکی سودوموناس آئروژینوزا

معصومه بیگ[۱]، محمد طاهری[۲]، محمد رضا عربستانی[۳،*]

[۱] کارشناسی ارشد میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

[۲] استادیار، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

[۳] دانشیار، مرکز تحقیقات سلامت تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

* **نویسنده مسئول:** محمد رضا عربستانی، مرکز تحقیقات سلامت تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران.

ایمیل: *mohammad.arabestani@gmail.com*

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۰۹/۲۹

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۰۱/۲۶

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی همدان محفوظ است.

چکیده

سابقه و هدف: به دلیل افزایش شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به ترکیبات بتالاکتام و کارباپنم‌ها، شناسایی ایزوله‌های مولد آنزیم‌های بتالاکتاماز برای درمان به موقع چنین ایزوله‌هایی ضروری می‌باشد. در این ارتباط، مطالعه حاضر با هدف تعیین شیوع ژن‌های متالوبتالاکتاماز و کارباپنماز (*MBL* و *KPC*) در میان ایزوله‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی- مقطعی، ۹۷ ایزوله بالینی از بیماران بستری در بیمارستان‌های شهر همدان از آبان ۱۳۹۶ تا اردیبهشت ۱۳۹۷ جمع‌آوری گردید. پس از تأیید سویه‌های جدا شده به روش فنوتیپی و ژنوتیپی، بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها به روش دیسک دیفیوژن آگار، MIC ایمی‌پنم با روش Etest، آزمون CDDT (Combination Disk Diffusion Test)، MHT (Modified Hodge Test) و شناسایی ژن‌های کارباپنماز به روش PCR انجام شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری نشان دادند که بیشترین میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک سفوکسیتین مربوط به ۹۲ ایزوله (۹۴/۸ درصد) و کمترین میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک پیپراسیلین-تازوباکتام مربوط به ۳۸ ایزوله (۳۹/۲ درصد) بوده است. از میان آنتی‌بیوتیک‌های کارباپنم، بیشترین میزان مقاومت نسبت به ایمی‌پنم مربوط به ۴۸ ایزوله (۴۹/۴ درصد) بود. از میان ۴۹ ایزوله‌ای (۵۰/۵۱ درصد) که به آنتی‌بیوتیک‌های کارباپنم مقاوم بودند، ۴۲ ایزوله (۸۵/۷۱ درصد) MIC مقاوم (<۸ میلی‌متر) نسبت به ایمی‌پنم داشتند، ۲۶ ایزوله (۵۳/۰۶ درصد) آزمون دیسک ترکیبی IMP/EDTA (CDDT) و ۲۵ ایزوله (۵۱/۰۲ درصد) آزمون MHT مثبت داشتند. نتایج PCR نشان دادند که بیشترین و کمترین حضور ژن در بین ایزوله‌ها مربوط به ژن *IMP*، ۲۰ (۴۰/۸ درصد) و ژن *GIM*، شش ایزوله (۱۲/۲۴ درصد) بوده است.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان دادند که درصد بالایی از ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزای* بررسی شده نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کارباپنم مقاوم بودند و درصد بالایی از ایزوله‌های مقاوم به کارباپنم‌ها مولد ژن‌های بتالاکتامازی بودند.

واژگان کلیدی: *سودوموناس آئروژینوزا*، *کارباپنماز*، *متالوبتالاکتاماز*

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا باکتری گرم منفی و پاتوژن فرصت‌طلبی است که عامل عفونت‌های مهم در افراد با ضعف سیستم ایمنی می‌باشد [۱]. هرچند آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام و به ویژه کارباپنم‌ها علیه عفونت‌های *سودوموناس آئروژینوزای* MDR (Multi Drug Resistant) مؤثر هستند؛ اما مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های کارباپنم از سراسر جهان در این باکتری‌ها گزارش شده است. مکانیسم‌های مقاومت به کارباپنم‌ها به دلایلی از جمله کاهش نفوذپذیری غشای خارجی، کاهش بیان یا نقص در پورین‌های غشای خارجی از جمله OprD، وجود ژن *AmpC* بتالاکتاماز کروموزومی، تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز و افزایش فعالیت سیستم‌های افلاکس پمپ رخ می‌دهد [۲]؛ به همین دلیل شناسایی سریع و دقیق سویه‌های تولیدکننده آنزیم‌های

کارباپنماز برای درمان مناسب و جلوگیری از گسترش سویه‌های مقاوم ضروری می‌باشد [۳]. نوعی از مقاومت به وسیله تولید آنزیم‌هایی به نام بتالاکتامازها صورت می‌گیرد که عامل مقاومت در برابر بتالاکتام‌ها می‌باشد. برای طبقه‌بندی بتالاکتامازها روش‌های متعددی وجود دارد که از میان آن‌ها طبقه‌بندی آمبلر و طبقه‌بندی بوش کاربرد بیشتری دارد. در طبقه‌بندی آمبلر براساس توالی آمینواسیدی آنزیم‌ها، چهار کلاس مختلف A، B، C و D وجود دارد. کلاس‌های A، C و D فعالیت آنزیمی خود را به وسیله مکانیسم سرین انجام می‌دهند؛ در صورتی که کلاس B برای فعالیت خود نیازمند عنصر روی می‌باشد. کارباپنمازهای کلاس A یک سرین بتالاکتاماز هستند که در جایگاه فعال آن‌ها سرین وجود دارد. KPC (Klebsiella Pneumoniae Carbapenemase) رایج‌ترین کارباپنماز کلاس A است که دارای تنوعی از KPC_2 تا KPC_{13} می‌باشد که تنها در موتانت‌های آمینو اسیدی تفاوت دارند [۴]. ژن bla_{KPC} روی یک پلاسمید قرار دارد که توسط Tn_3 و Tn_{4401} در میان سویه‌های باکتریایی منتقل می‌شوند. وجود KPC در پلاسمیدهای قابل انتقال و ترانسپوزون‌ها موجب گسترش سریع میان باکتری‌ها از جمله *کلبسیلا پنومونیه، انتروباکتر، اسینتوباکتر بومانی و سودوموناس آئروژینوزا* می‌شود. کارباپنمازهای کلاس B به عنوان MBL شناخته می‌شوند که در جایگاه فعالیت آن‌ها ZN وجود دارد [۵]. متالوبتالاکتامازها به دلیل ایجاد مقاومت به کارباپنم‌ها که از مؤثرترین آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده علیه عفونت‌های سودوموناسی هستند [۶]، بسیار قابل توجه می‌باشند. آنزیم‌های MBL داخل اینتگرون واقع شده و توانایی ادغام در پلاسمید یا کروموزوم و نیز قابلیت انتقال به سایر ایزوله‌های *سودوموناس* و یا باکتری‌های دیگر از جمله انتروباکتریاسه‌ها را دارند [۷]. متالوبتالاکتامازها براساس ساختار مولکولی به انواع مختلفی تقسیم می‌شوند که عبارت هستند از: IMP (Imipenemase)، VIM (Verona Imipenemase)، GIM (German Imipenemase)، SPM (Sao Paulo) و NDM (New Delhi Metallo-Beta-Lactamase) که از میان آن‌ها IMP در *سودوموناس آئروژینوزا* بارزتر می‌باشد [۸،۹]. بعدها کلاس‌های دیگری از بتالاکتامازهای سرین (کلاس C) نیز یافت شدند که توالی آمینو اسیدی آن‌ها مشابه با کلاس A بود. اعضای این کلاس به آنزیم‌های AmpC نیز معروف هستند و قادر به هیدرولیز فسفومایسین‌ها و سفالوسپورین‌ها می‌باشند. دسته‌ای از بتالاکتامازهای سرین نیز وجود دارند که تشابه اندکی با بتالاکتامازهای کلاس A و C دارند و تحت عنوان OXA (Oxacilin-hydrolyzine) یا اگزاسیلینازها نام‌گذاری می‌شوند. این بتالاکتامازها در کلاس D جای گرفته‌اند. آزمون‌های فنوتیپی متنوعی جهت شناسایی سریع و مقرون به صرفه کارباپنمازها گسترش یافته‌اند. به منظور تشخیص اختصاصی آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز از مهارکننده‌ها استفاده می‌گردد. از معمول‌ترین مهارکننده‌هایی که استفاده می‌شوند می‌توان به EDTA (Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid) و دیپیکولونیک اسید اشاره نمود [۱۰]. EDTA به عنوان عامل شلاته‌کننده یون روی دو ظرفیتی عمل نموده و با جمع‌آوری کردن این یون از محیط عملکرد آنزیم، مانع از فعالیت آن می‌شود. براساس دستورالعمل CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)، آزمون فنوتیپی برای شناسایی سویه‌های تولیدکننده آنزیم کارباپنماز، MHT معرفی شده است.

با توجه به اهمیت ویژه داروهای کارباپنم در درمان عفونت‌های غیر قابل درمان با آنتی‌بیوتیک‌های معمول و نیز لزوم دستیابی به آنتی‌بیوتیک‌های کارآمد دیگر برای درمان این عفونت‌ها، مطالعه حاضر با هدف تعیین فراوانی مقاومت به داروهای کارباپنم در سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* و تعیین الگوی مقاومت اکتسابی آن‌ها و نیز بررسی فنوتیپی فراوانی آنزیم کارباپنماز *سودوموناس آئروژینوزا* در این سویه‌ها صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

در مطالعه توصیفی- مقطعی حاضر طی یک دوره نه ماهه از آبان ۱۳۹۶ تا اردیبهشت ۱۳۹۷ ایزوله‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* از بخش‌های مختلف بیمارستان‌های آموزشی شهر همدان (بعثت، سینا و بهشتی) که شامل: نمونه‌های خون، ادرار، زخم، مایع مغزی- نخاعی، تراشه، خلط و آسپیراسیون بودند، جمع‌آوری شدند. سپس ایزوله‌های باکتریایی به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی منتقل گردیدند. جهت تأیید ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزای جمع‌آوری شده از آزمون‌های بیوشیمیایی مختلف شامل: رشد در محیط مک‌کانکی آگار، آزمون اکسیداز، کاتالاز، واکنش در محیط TSI (Triple Suger Iron)، آزمون OF، بررسی تحرک، رشد در محیط ستریماید آگار، رشد در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و تولید پیوسیانین در محیط مولر هینتون آگار استفاده شد.

آزمون تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های باکتریایی

در فاز بعدی مطالعه، نمونه‌ها در دستور کار تعیین حساسیت آنتی‌بیوتکی قرار گرفتند. آزمون آنتی‌بیوگرام براساس دستورالعمل CLSI (۲۰۱۸) با استفاده از روش دیسک دیفیوژن آگار انجام شد. از سویه *سودوموناس آئروژینوزا* با شماره ATCC 27853 جهت کنترل استفاده گردید. انجام این آزمون با استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های زیر (تهیه شده از شرکت MAST، انگلیس) صورت گرفت [۱۱]:

پیپراسیلین (۱۰۰ میکروگرم)، پیپراسیلین + تازوباکتام (۱۰۰/۱۰ میکروگرم)، سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم

(۳۰ میکروگرم)، سفوکسیتین (۳۰ میکروگرم)، سفتریاکسون (۳۰ میکروگرم)، آزترونام (۳۰ میکروگرم)، ایمی‌پنم (۱۰ میکروگرم)، مروپنم (۱۰ میکروگرم)، دوری‌پنم (۱۰ میکروگرم)، آمیکاسین (۳۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم) و تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم).

تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC)

در این روش حداقل غلظت مهاری برای ایمی‌پنم با استفاده از نوار Etest (شرکت MAST، انگلیس) تعیین شد. به این صورت که ابتدا سوسپانسیون نیم مک‌فارلند از نمونه‌های مورد نظر تهیه گردید و سپس روی سطح محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. پس از چند دقیقه نوار Etest ایمی پنم روی سطح پلیت قرار گرفت و پلیت‌ها به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیده و نتایج خوانده شدند [۱۲].

آزمون‌های فنوتیپی جهت شناسایی آنزیم‌های کاربا‌پنماز استفاده از مهارکننده CDDT

جهت تشخیص اختصاصی آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز از مهارکننده‌ها استفاده می‌گردد. از این ماده شیمیایی به دو روش دیسک ترکیبی و استفاده از خاصیت سینرژیسم بین آن و دیسک ایمی‌پنم و یا سفتازیدیم جهت شناسایی متالوبتالاکتاماز استفاده می‌شود. در این روش از باکتری‌هایی که نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کاربا‌پنم مقاوم و یا نیمه حساس بودند، سوسپانسیون نیم مک‌فارلند تهیه گردید. سپس به صورت چمنی روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد و پس از آن دیسک ایمی‌پنم مورد استفاده قرار گرفت. به این صورت که دیسک ایمی‌پنم (۱۰ میکروگرم) به تنهایی و در مجاورت یک دیسک IMP-EDTA (ایمی‌پنم- EDTA) (شرکت روسکو، روسیه) قرار داده شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. افزایش ۷ میلی‌متری قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک IMP-EDTA نشان‌دهنده حضور متالوبتالاکتاماز بود [۱۳].

آزمون MHT (Modified Hodge Test)

آزمون MHT برای بررسی وجود آنزیم کاربا‌پنماز مطابق با دستورالعمل CLSI (۲۰۱۷) انجام شد. بدین‌صورت که سوسپانسیون باکتری با رقت نیم مک‌فارلند از باکتری *Ecoli* ATCC25922 تهیه شد و سپس رقت ۱/۱۰ با سرم فیزیولوژی از سوسپانسیون مرحله قبل با رقت نیم مک‌فارلند تهیه گردید. سپس کشت چمنی با استفاده از سواپ استریل از سوسپانسیون با رقت ۱/۱۰ *Ecoli* ATCC25922 روی محیط مولر هینتون آگار انجام شد. در ادامه، پلیت به مدت ۳ تا ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد تا جذب محیط گردد. سپس یک دیسک ارتاپنم ۱۰ میکروگرمی در مرکز پلیت قرار داده شد. از سوسپانسیون‌های ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* که به آنتی‌بیوتیک‌های کاربا‌پنم مقاوم یا نیمه حساس بودند برای بررسی تولید آنزیم کاربا‌پنماز استفاده گردید. بدین‌منظور از لبه دیسک قرار داده شده در مرکز پلیت به سمت لبه پلیت کشت خطی داده شد و در ادامه پلیت به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. هاله عدم رشد به شکل برگ شبدری به عنوان سویه مولد آنزیم کاربا‌پنماز تعیین شد [۱۴،۱۵].

در این مطالعه از *کلبسیلا پنومونیه* استاندارد با شماره ATCC BAA-1705 به عنوان کنترل مثبت و از *کلبسیلا پنومونیه* استاندارد با شماره ATCC BAA-1706 به عنوان کنترل منفی (تهیه شده از مرکز تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران) استفاده شد.

استخراج DNA و انجام PCR

استخراج DNA به روش Boiling انجام شد [۱۶]. DNA استخراج شده از نظر کمی و کیفی با استفاده از دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز روی ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت.

واکنش PCR و تعیین توالی نواحی کدکننده آنزیم‌های کاربا‌پنماز

پرایمرهای مورد استفاده مطابق با پروتکل شرکت سازنده با افزودن مقادیر مشخصی از آب دیونیزه استریل، رقیق شده و محلول‌های کاری به غلظت ۱۰ پیکومولار از آن‌ها تهیه گردید. مواد مورد نیاز برای PCR در یک واکنش ۲۵ میکرولیتری با حجم و غلظت‌های زیر برای هر نمونه آماده شد و در یک میکروتیوب ۰/۲ میلی‌لیتری با یکدیگر مخلوط شدند. قابل ذکر است که به منظور انجام PCR برای چند نمونه، حجم و غلظت مواد واکنش‌دهنده یکسان براساس تعداد واکنش محاسبه گردید. سپس در یک میکروتیوب استریل با یکدیگر مخلوط شده و در نهایت به مقدار مساوی و مشخص در میکروتیوب‌های ۰/۲ میلی‌لیتری توزیع گردیدند. سپس نمونه‌ها مطابق با برنامه دمایی ذکر شده در جدول ۱ درون دستگاه ترموسایکلر قرار گرفتند. در این مطالعه از *سودوموناس آئروژینوزای* تأیید شده دارای ژن‌های *MBL* به عنوان کنترل مثبت برای ژن‌های *MBL* و *سودوموناس آئروژینوزای* حاوی ژن *KPC* به عنوان کنترل مثبت برای ژن *KPC* استفاده شد (تهیه شده از مرکز تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران). مطابق با پرایمرهای ذکر شده در جدول ۲ و برنامه دمایی ژن‌ها در جدول ۱، حضور ژن‌های تولیدکننده آنزیم‌های MBL و KPC در ایزوله‌های باکتریایی با استفاده از روش PCR تأیید گردید. روش PCR برای ژن‌های *IMP* و *VIM* به روش مولتی‌پلکس PCR انجام شد. ابتدا پرایمرها در وب‌سایت www.ncbi.nlm.nih.gov به منظور تأیید اختصاصیت آن‌ها برای جنس سودوموناس گونه آئروژینوزا BLAST شدند. در این

جدول ۱: برنامه دمایی PCR ژن‌های *acsA*، *gim*، *sim*، *spm*، *kpc*، *vim* و *imp*

سیکل	طویل‌سازی نهایی	طویل‌سازی	اتصال	دناتوراسیون	دناتوراسیون اولیه	ژن
۳۰	۷۲ ۵ min	۷۲ ۱ min	۵۶ ۱ min	۹۵ ۱ min	۹۵ ۵ min	*kpc*
۳۵	۷۲ ۵ min	۷۲ ۱ min	۵۵ ۱ min	۹۵ ۱ min	۹۵ ۵ min	*vim* و *imp*
۳۵	۷۲ ۱۰ min	۷۲ ۱ min	۵۶ ۱ min	۹۵ ۱ min	۹۵ ۵ min	*sim*
۳۵	۷۲ ۷ min	۷۲ ۱ min	۶۰ ۴۰s	۹۴ ۴۰s	۹۴ ۱۰ min	*spm* و *gim*
۳۵	۷۲ ۵ min	۷۲ ۵ min	۵۵ ۱ min	۹۵ ۱ min	۹۵ ۵ min	*acsA*

جدول ۲: پرایمر جهت انجام آزمون PCR برای ژن‌های acsA، *GIM*، *IM*، *SPM*، *VIM* و *IMP*

Family	Primer	Sequence (5′–3′)	bp	References
***kpc*-1 to *kpc*-5**	KPC-F KPC-R	GAT GGT GTT TGG TCG CAT A CGA ATG CGC AGC ACC AG	۵۷۸	[۱۷]
imp	IMP-F IMP-R	GGA ATA GAG TGG CTT AAY TCT C CCA AAC YAC TAS GTT ATC T	۱۸۸	[۱۸]
vim	VIM-F VIM-R	GAT GGT GTT TGG TCG CAT A CGA ATG CGC AGC ACC AG	۳۹۰	[۱۸]
***spm*-1**	SPM-1F SPM-1R	AAA ATC TGG GTA CGC AAA CG ACA TTA TCC GCT GGA ACA GG	۲۷۱	[۱۹]
***sim*-1**	SIM-1F SIM-1F	TAC AAG GGA TTC GGC ATC G TAA TGG CCT GTT CCC ATG TG	۵۷۰	[۱۹]
gim	GIM-1F GIM-2R	TCG ACA CAC CTT GGT CTG AA AAC TTC CAA CTT TGC CAT GC	۴۷۷	[۱۹]
acsA	acsA-1F acsA-2R	ACCTGGTGTACGCCTCGCTGAC GACATAGATGCCCTGCCCCTTGAT	۸۲۳	[۲۰]

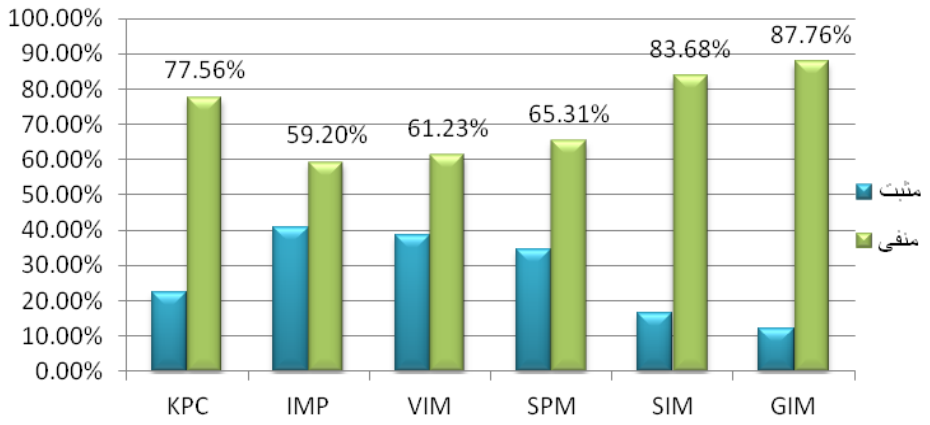
مطالعه از *سودوموناس آئروژینوزای* تأیید شده دارای ژن‌های *MBL* به عنوان کنترل مثبت برای ژن‌های *MBL* و *سودوموناس آئروژینوزای* حاوی ژن *KPC* به عنوان کنترل مثبت برای ژن *KPC* استفاده شد (تهیه شده از مرکز تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران).

یافته‌ها

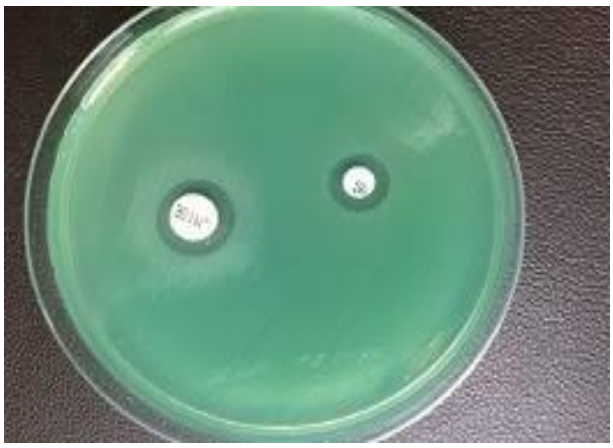
جمع‌آوری ایزوله‌ها و آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی

۱۱۵ باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* از بیماران بستری در بیمارستان‌های شهر همدان جداسازی گردید و براساس آزمون‌های تشخیص آزمایشگاهی، ۹۷ ایزوله (۸۴/۳۴ درصد) به عنوان *سودوموناس آئروژینوزا* مورد تأیید قرار گرفت. آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی براساس دستورالعمل CLSI (۲۰۱۸) انجام شد. میزان مقاومت *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بررسی شده در شکل ۱ نشان داده شده است.

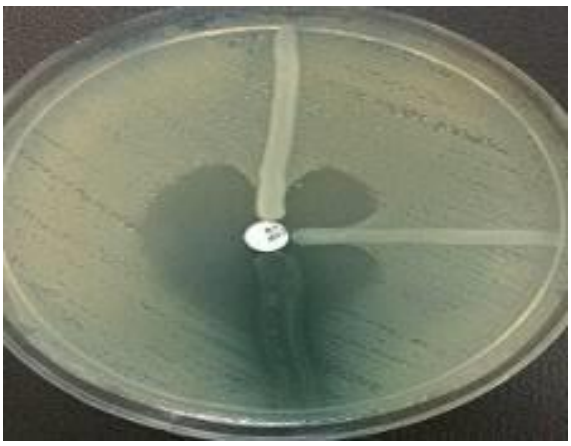
مطابق با نتایج، بیشترین میزان مقاومت نسبت به



شکل ۱: فراوانی ژن‌های *SPM*، *SIM*، *GIM*، *VIM*، *IMP* و *KPC* در ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا*



شکل ۲: اثر سینرژیسم بین EDTA و ایمی‌پنم



شکل ۳: سویه‌های MHT مثبت *سودوموناس آئروژینوا*

آنتی‌بیوتیک سفوکسیتین در ۹۱ ایزوله (۹۳/۸ درصد) مشاهده شد و کمترین میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک پیپراسیلین-تازوباکتام مربوط به ۳۸ ایزوله (۳۹/۲ درصد) بود.

نتایج حاصل از تعیین حداقل غلظت مهاری به ایمی‌پنم توسط نوار Etest

از میان ۴۹ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزای* مقاوم و نیمه حساس نسبت به کاربابنم، ۴۲ ایزوله (۸۵/۷ درصد) براساس آزمون MIC مقاوم و ۷ ایزوله (۱۴/۲۸ درصد) نسبت به ایمی‌پنم حساس بودند.

آزمون‌های فنوتیپی تعیین ایزوله‌های مولد آنزیم متالوبتالاکتاماز به روش CDDT

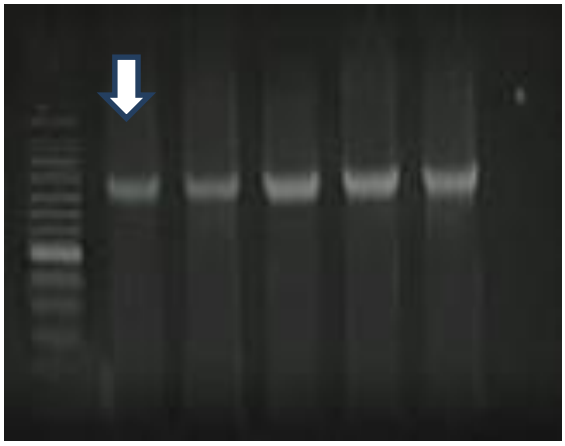
از میان ۴۹ ایزوله مقاوم به کاربابنم، ۲۶ ایزوله (۵۳/۰۶ درصد) دارای نتایج مثبت و ۲۳ ایزوله (۴۶/۹۳ درصد) دارای نتایج منفی بودند (شکل ۲).

آزمون فنوتیپی شناسایی ایزوله‌های مولد آنزیم کلبسیلا پنومونیه کاربابنماز

از میان ۴۹ ایزوله مقاوم به کاربابنم، ۲۵ ایزوله (۵۱/۲ درصد) دارای نتایج مثبت و ۲۴ ایزوله (۴۸/۹۷ درصد) دارای نتایج منفی بودند (شکل ۳).

تعیین هویت ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا به روش مولکولی

در این مطالعه جهت افزایش دقت و صحت در تشخیص باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* از ژن *acsA* با طول باند ۸۲۳ bp استفاده شد (شکل ۴). در این مطالعه تمامی ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* که از نظر آزمون‌های بیوشیمیایی مورد سنجش اولیه قرار گرفته بودند و توسط این آزمون‌ها به عنوان *سودوموناس آئروژینوزا* شناسایی شده بودند، دارای ژن *acsA* بودند.

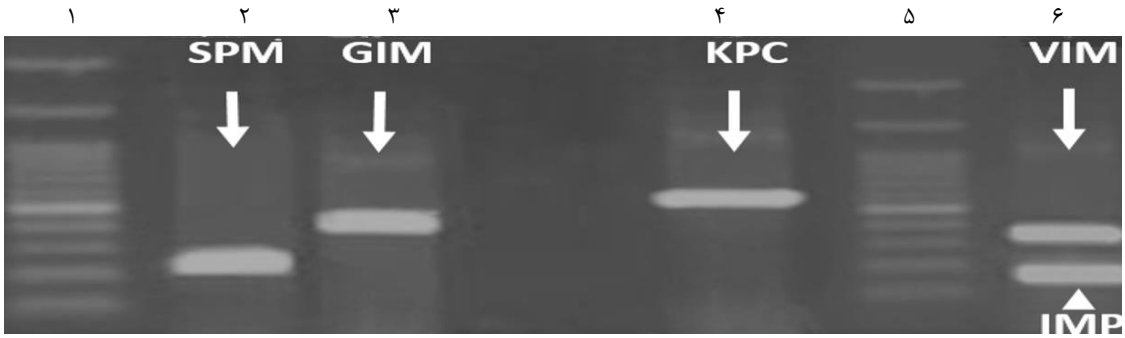


شکل ۴: نتیجه الکتروفورز تکثیر محصولات ژن استاندارد *acsA* (۸۲۳ bp) جهت تأیید ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا*

از میان ۴۹ ایزوله مقاوم به کاربابنم، ژن *IMP* در ۲۰ ایزوله (۴۰/۸۱ درصد)، ژن *VIM* در ۱۹ ایزوله (۳۸/۷۷ درصد)، ژن *GIM* در ۶ ایزوله (۱۲/۲۴ درصد)، ژن *KPC* در ۱۱ ایزوله (۲۲/۴۴ درصد)، ژن *SPM* در ۱۷ ایزوله (۳۴/۶۹ درصد) و ژن *SIM* در ۸ ایزوله (۱۶/۳۲ درصد) مشاهده گردید (شکل ۵). تنها یک ایزوله دارای تمامی ژن‌های *MBL* مورد بررسی (*IMP*، *SIM*، *SPM*، *VIM* و *GIM*) بود (شکل ۱).

بحث

آنتی‌بیوتیک‌های کاربابنم خط آخر درمان برای بیشتر عفونت‌های باکتریایی به ویژه *سودوموناس آئروژینوزا* می‌باشند؛ اما تأثیر این آنتی‌بیوتیک‌های مهم به دلیل گسترش باکتری‌های مقاوم به کاربابنم کاهش یافته است [۲۱]. تولید آنزیم‌های MBL در سراسر جهان در حال گسترش بوده و سویه‌های مولد این آنزیم‌ها مسئول طولانی شدن دوره عفونت و عدم درمان با آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام هستند. KPC نیز از جمله آنزیم‌هایی می‌باشد که موجب بی‌اثر کردن آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام به ویژه کاربابنم است.



شکل ۵: نتیجه الکتروفورز ژن‌های مورد مطالعه: چاهک ۱= مارکر (۱۰۰ bp) شرکت فرمنتانس؛ چاهک ۲= ژن *SPM* (۲۷۱ bp)؛ چاهک ۳= ژن *GIM* (۴۷۷ bp)؛ چاهک ۴= کنترل منفی؛ چاهک ۵= ژن *KPC*؛ چاهک ۶= ژن‌های *IMP* (۱۸۸ bp) و *VIM* (۳۹۰ bp)

در این راستا، در مطالعه‌ای که توسط سیاسی و همکاران در سال ۲۰۱۸ در ارتباط با ۵۰ ایزوله بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* انجام شد، میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین، پیپراسین-تازوباکتام، مروپنم، ایمی‌پنم و سفتازیدیم به ترتیب برابر با ۴۰، ۱۶، ۶۲، ۵۳ و ۵۰ درصد بود [۲۲]. در مطالعه حاضر میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مذکور ۵۴/۶، ۳۹/۲، ۴۱/۲، ۴۹/۴۸ و ۴۱/۲ درصد بود. بر مبنای نتایج، میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و پیپراسیلین-تازوباکتام بیشتر از مطالعه سیاسی بود و میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ایمی‌پنم، مروپنم و سفتازیدیم در مطالعه سیاسی بیشتر از مطالعه حاضر بود. همچنین مقاومت نسبت به بتالاکتام‌ها کمتر از مطالعه سیاسی بود که احتمالاً ناشی از تفاوت در الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های دو منطقه می‌باشد.

در مطالعه‌ای که توسط گوزالان در سال ۲۰۱۸ در ارتباط با ۹۵۱ ایزوله بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* در کشور ترکیه انجام شد، میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ایمی‌پنم، مروپنم و سفتازیدیم به ترتیب برابر با ۳۳/۳، ۴۶ و ۲۳/۴ درصد بود [۲۳]. میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های ایمی‌پنم و سفتازیدیم در مطالعه حاضر بسیار بیشتر از این مقادیر بود؛ اما مقاومت به مروپنم در مطالعه مذکور (۴۱/۲ درصد) تقریباً نزدیک به مطالعه حاضر بود.

از سوی دیگر، طبسی و همکاران مطالعه‌ای را در سال ۲۰۱۸ در تهران انجام دادند. در این مطالعه از ۳۰۶ ایزوله بالینی *سودوموناس آئروژینوزا*، ۶۴/۷ درصد مقام به ایمی‌پنم بودند که از این میان، ۲۸۹ ایزوله (۹۴/۵ درصد) مولد MBL بودند [۲۴]. میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی به ایمی‌پنم ۴۷/۴ درصد که از این میان ۲۶/۸ درصد MBL مثبت بودند که کمتر از میزان به دست آمده در مطالعه طبسی بود. این اختلاف می‌تواند ناشی از تعداد بیشتر نمونه‌های طبسی و نیز ایزوله‌های جدا شده از مناطق جغرافیایی مختلف باشد.

همچنین در مطالعه‌ای که توسط احمد و همکاران در سال ۲۰۱۷ در مصر انجام شد، از میان ۵۰ ایزوله بالینی *سودوموناس آئروژینوزای* مقام به ایمی‌پنم، ۶۶ درصد دارای MHT و ۱۸ درصد دارای CDDT مثبت بودند که از میان آن‌ها، ۲۶ درصد دارای ژن *IMP* و ۳۰ درصد دارای ژن *KPC* بودند [۲۵]. سویه‌های MHT و CDDT مثبت در مطالعه حاضر به ترتیب ۵۳/۰۶ و ۵۱/۰۲ درصد بود که از میان آن‌ها، ۴۰/۸ درصد دارای ژن *IMP* و ۲۲/۴۴ درصد دارای ژن *KPC* بودند که این میزان کمتر از مطالعه مذکور بود. دلیل این امر احتمالاً تفاوت منطقه‌ای و الگوی مصرف آنتی‌بیوتیکی می‌باشد.

از سوی دیگر، در مطالعه‌ای که توسط حقی و همکاران در سال ۲۰۱۷ در تهران انجام شد، از میان ۸۰ ایزوله بالینی *سودوموناس آئروژینوزا*، شش ایزوله (۷/۵ درصد) MHT و ۲۳ ایزوله (۲۹/۲ درصد) CDDT مثبت داشتند. همچنین ۶/۳ درصد دارای ژن *VIM* و ۵ درصد دارای ژن *KPC* بودند [۲۶]. در مطالعه حاضر درصد سویه‌های MHT مثبت ۵۱/۰۲ درصد بود؛ به همین دلیل حضور ژن *KPC* (۲۲/۴۴ درصد) نیز به همین میزان بالاتر از مطالعه حقی بود.

واعظ و همکاران نیز مطالعه‌ای را در سال ۲۰۱۸ در ارتباط با ۱۲۰ ایزوله بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* در ایران انجام دادند. در این مطالعه ۳۵ ایزوله (۲۹/۲ درصد) مولد MBL بودند که از میان آن‌ها ۲۸ ایزوله (۸۰ درصد) دارای ژن *IMP*، ۲۰ ایزوله (۵۷ درصد) دارای ژن *SPM* و ۵ ایزوله (۱۴/۳ درصد) حاوی ژن *SIM* بودند [۲۷]. میزان حضور ژن‌های مذکور در نمونه‌های مورد مطالعه ما ۴۰/۸، ۳۴/۶ و ۱۶/۳۲ درصد بود که بر این اساس، فراوانی ژن‌های *IMP* و *SPM* در مطالعه همتی بسیار بالاتر از مطالعه حاضر بوده است که احتمالاً ناشی از تفاوت در نوع ایزوله‌های بالینی دو منطقه می‌باشد؛ اما فراوانی ژن *SIM* در این دو مطالعه بسیار نزدیک به یکدیگر بود.

همچنین در مطالعه‌ای که توسط وحدانی و همکاران در سال ۲۰۱۲ در تهران انجام شد، از میان ۲۴۱ ایزوله بالینی *سودوموناس آئروژینوزا*، ۸۶ ایزوله نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کاربابنم مقاوم بودند که از این میان، ۷۵ ایزوله MHT مثبت داشتند و تنها دو ایزوله با استفاده از روش PCR مولد ژن *KPC* بودند [۲۸]. با توجه به نتایج مطالعه مذکور می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که میزان حساسیت روش فنوتیپی (MHT)

نسبت به روش PCR پایین بوده است؛ بنابراین جهت تأیید ایزوله‌های مولد آنزیم‌های کارباپنماز می‌بایست از روش ژنوتیپی استفاده کرد.

نتیجه‌گیری

می‌توان چنین استنتاج نمود که توانایی تولید آنزیم‌های کارباپنماز یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های مقاومت به کارباپنم‌ها می‌باشد. مهم‌ترین این آنزیم‌ها *MBL* و *KPC* هستند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان دادند که اکثر ایزوله‌هایی که نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کارباپنم مقاوم بودند، دارای ژن‌های *MBL* و *KPC* بودند. سویه‌های باکتریایی تولیدکننده کارباپنمازها می‌توانند باعث مقاومت به تمامی آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام و حتی در حضور برخی از آنزیم‌ها باعث مقاومت به دیگر خانواده‌های آنتی‌بیوتیکی نظیر آمینوگلیکوزیدها و فلوروکینولون‌ها گردند؛ در نتیجه درمان این عفونت‌ها به عنوان یک مشکل مهم در مراکز بهداشتی- درمانی مطرح می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد میکروب‌شناسی مصوب دانشگاه علوم پزشکی همدان با شماره ۹۶۱۰۱۲۶۵۱۴ می‌باشد. بدین‌وسیله نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت محترم تحقیقات و فناوری و کارکنان آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه به دلیل همکاری در مسیر انجام این مطالعه ابراز می‌نمایند.

تضاد منافع

بین نتایج مطالعه و منافع نویسندگان هیچ‌گونه تعارضی وجود ندارد.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه دارای تأییدیه از کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی همدان با کد IR.UMSHA.REC.1396.662 می‌باشد.

سهم نویسندگان

نویسنده اول (پژوهشگر اصلی): طراحی پروژه، نگارش پروپوزال، جمع‌آوری داده‌ها، آنالیز آماری و تدوین بخش روش‌شناسی و بحث، نگارش درفت اولیه مقاله و ویرایش آن: ۴۰ درصد؛ نویسنده دوم (پژوهشگر اصلی): تدوین بخش مقدمه، مشارکت در طراحی پروژه و نگارش مقاله: ۲۰ درصد؛ نویسنده سوم (پژوهشگر اصلی): مسئول مکاتبات، مشارکت در نگارش پروپوزال و آنالیز آماری، تدوین بخش نتایج، بازنگری متون و نگارش مقاله: ۴۰ درصد.

حمایت مالی

این پروژه با حمایت مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی همدان انجام شده است.

REFERENCES

1. Potron A, Poirel L, Nordmann P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Int J Antimicrob Agents*. 2015;**45**(6):568-85. PMID: 25857949 DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2015.03.001
2. Wolter DJ, Lister PD. Mechanisms of beta-lactam resistance among *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Pharm Des*. 2013; **19**(2):209-22. PMID: 22894618
3. Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs*. 2007;**67**(3): 351-68. PMID: 17335295 DOI: 10.2165/00003495-200767030-00003
4. Öztürk H, Ozkirimli E, Özgür A. Classification of Beta-lactamases and penicillin binding proteins using ligand-centric network models. *PloS One*. 2015;**10**(2):e0117874. PMID: 25689853 DOI: 10.1371/journal.pone.0117874
5. Shaikh S, Fatima J, Shakil S, Rizvi SMD, Kamal MA. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi J Biol Sci*. 2015;**22**(1):90-101. PMID: 25561890 DOI: 10.1016/j.sjbs.2014.08.002
6. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv*. 2018; **37**(1):177-92. PMID: 30500353 DOI: 10.1016/j.biotechadv.2018.11.013
7. Sujatha R, Goyal R, Mishra V. Detection of metallo beta lactamase producing *pseudomonas aeruginosa* among clinical isolates. *Int J Curr Microbiol App Sci*. 2017; **6**(2):1567-73. DOI: 10.20546/ijcmas.2017.602.175
8. Pathak P, Jaishi N, Yadav BK, Shah PK. Prevalence of extended spectrum beta lactamases (ESBL) and metallo beta lactamases (MBL) mediated resistance in gram negative bacterial pathogens. *Tribhuvan Univ J Microbiol*. 2017; **4**(1):49-54.
9. Amini K, Mobasseri P. Detection rate of metallo-β-lactamase-expressing genes; blaVIM-1, blaVIM-2 and blaSPM-1 in *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Int J Basic Sci Med*. 2017;**2**(1):41-5. DOI: 10.15171/ijbsm.2017.09
10. Galvani AA, Tukmechi A. Determination of the prevalence of metallo-β-lactamases producing *Pseudomonas aeruginosa* strains from clinical samples by imipenem-EDTA combination disk method in Mottahari and Emam Khomaini hospitals of Urmia. *Rep Health Care*. 2015;**1**(2):65-8.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018. P. 38-40.
12. Humphries RM, Hindler JA, Magnano P, Wong-Beringer A, Tibbetts R, Miller SA. Performance of ceftolozane-tazobactam Etest, MIC test strips and disk diffusion as compared to reference broth microdilution for beta-lactam resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *J Clin Microbiol*. 2017;56(3):e01633-17. PMID: 29212704 DOI: 10.1128/JCM.01633-17
13. Pasteran F, Veliz O, Faccone D, Guerriero L, Rapoport M, Mendez T, et al. A simple test for the detection of KPC and metallo-β-lactamase carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clin Microbiol Infect*. 2011;**17**(9):1438-41. PMID: 21689207 DOI: 10.1111/j.1469-0691.2011.03585.x
14. Carvalhaes CG, Picão RC, Nicoletti AG, Xavier DE, Gales AC. Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in Klebsiella pneumoniae: be aware of false positive results. *J Antimicrob Chemother*. 2009; **65**(2):249-51. PMID: 19996141 DOI: 10.1093/jac/dkp431
15. Doumith M, Ellington MJ, Livermore DM, Woodford N. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant Klebsiella and Enterobacter spp. clinical isolates from the UK. *J Antimicrob Chemother*. 2009;

63(4):659-67. PMID: 19233898 DOI: 10.1093/jac/dkp029
16. Honda K, Muramatsu H, Yano S, Ishizawa F, Iwabuchi Y, Sugano Y. Purification and concentration of DNA using l-fucose-specific lectin. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser*. 2017;**6**:e177-9. DOI: 10.1016/j.fsigss.2017.09.074
17. Cheruvanky A, Stoesser N, Sheppard AE, Crook DW, Hoffman PS, Weddle E, et al. Enhanced *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC) expression from a novel Tn4401 deletion. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017; **61**(6):e00025-17. PMID: 28373185 DOI: 10.1128/AAC.00025-17
18. Wang TH, Leu YS, Wang NY, Liu CP, Yan TR. Prevalence of different carbapenemase genes among carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii blood isolates in Taiwan. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2018;**7**:123. PMID: 30338061 DOI: 10.1186/s13756-018-0410-5
19. Ellington MJ, Kistler J, Livermore DM, Woodford N. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-β-lactamases. *J Antimicrob Chemother*. 2006; **59**(2):320-2. PMID: 17185300 DOI: 10.1093/jac/dkl481
20. Gardner JG, Grundy FJ, Henkin TM, Escalante-Semerena JC. Control of acetyl-coenzyme A synthetase (AcsA) activity by acetylation/deacetylation without NAD+ involvement in bacillus subtilis. *J Bacteriol*. 2006;**188**(15):54-60. PMID: 16855235 DOI: 10.1128/JB.00215-06
21. Livermore DM. Interplay of impermeability and chromosomal beta-lactamase activity in imipenem-resistant Pseudomonas aeruginosa. *Antimicrob Agents Chemother*. 1992;**36**(9):2046-8. PMID: 1329641 DOI: 10.1128/aac.36.9.2046
22. Siasi E, Rafiei Tabatabaii R, Moslehimehr F. Isolation of bla_vim gene in Antibiotic resistant *Pseudomonas aeruginosa* from hospitals. *Cell Mol Biol J*. 2018;**8**(29):97-106. [Persian]
23. Gozalan A, Coskun-Ari FF, Ozdem B, Unaldi O, Celikbilek N, Kirca F, et al. Molecular characterization of vancomycin-resistant Enterococcus faecium strains isolated from carriage and clinical samples in a tertiary hospital, Turkey. *J Med Microbiol*. 2015;**64**(7):66-75. PMID: 25976005 DOI: 10.1099/jmm.0.000088
24. Tabasi M, Azizian R, Eskandarion MR, Habibi M, Asadi Karam MR. Detection of Metallo-β-Lactamases (MBLs) producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Tehran hospitals, Iran. *J Med Microbiol Infect Dis*. 2017;**5**(3):47-50. DOI: 10.29252/JoMMID.5.3.4.47
25. Ahmed OM, Manal AA, Samia AG. Evaluation of a new phenotypic method to screen for OprD-deficient mutant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Curr Microbiol App Sci*. 2017;**6**(2):1894-901.
26. Haghi F, Keramati N, Hemmati F, Zeighami H. Distribution of integrons and gene cassettes among metallo-β-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Infect Epidemiol Microbiol*. 2017;**3**(2):36-40. DOI: 10.18869/modares.iem.3.2.36
27. Vaez H, Khademi F, Salehi-Abargouei A, Sahebkar A. Metallo-beta-Lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Iran: a systematic review and meta-analysis. *Infez Med*. 2018;**26**(3):216-25. PMID: 30246764
28. Vahdani M, Azimi L, Asghari B, Bazmi F, Rastegar Lari A. Phenotypic screening of extended-spectrum β-lactamase and metallo-β-lactamase in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from infected burns. *Ann Burns Fire Disasters*. 2012;**25**(2):78-81. PMID: 23233825