

Original article

Molecular Detection of Metallo-beta-lactamases Genes in *Pseudomonas Aeruginosa* Isolated from the Burn Patients

Fatemeh Kamani¹, Taghi Zahrai Salehi^{2*}

1. MSc in Microbiology, Faculty of Science, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran
2. Professor, Tehran University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, Tehran, IR Iran

Corresponding Author:

Taghi Zahrai Salehi, Tehran University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, Tehran, Iran

Email: Tsalehi@ut.ac.ir

Received: 4 September 2015

Revised: 27 September 2015

Accepted: 21 November 2015

ABSTRACT

Background & Objectives: *Pseudomonas aeruginosa* is a leading cause of Hospital-acquired infection worldwide. The organisms isolated are often resistant to multiple antimicrobials particularly which are metallo-beta-lactamases (MβL) producers. Therefore, the present study was designed to molecular detection of Metallo-beta-lactamases genes in *P. aeruginosa* isolated from the burn patients.

Materials and methods: This descriptive, cross-sectional study was performed between October to March 2014 on the 55 no duplicative and non-repetitive samples collected from burn patients in Tehran, Iran. Multiplex-PCR assay was done in order to detection of IMP, VIM, SPM, GIM-1 and SIM-1 genes in the strains.

Results: The average age of the population studied was 49 years, with a range of 15 to 89 years. Forty-three (78.2%) were male and 12(21.8%) were female. the distribution of the IMP, VIM, SPM, GIM-1 and SIM-1 genes were 2(3.63%), 0(0.00%), 2(3.63%), 2(3.63%) and 0(0.00%), respectively.

Conclusion: MβL producing *P. aeruginosa* is an emerging threat in burn patients and a cause of concern for physicians treating such infections.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Metallo-beta-lactamases genes, burn patients

► **Citation:** Kamani F, Zahrai Salehi T. Molecular Detection of Metallo-beta-lactamases Genes in *Pseudomonas Aeruginosa* Isolated from the Burn Patients. *Tabari J Prev Med*. Autumn 2015;1(2):53-60.

شناسایی مولکولی ژن‌های متالوبتالاکتامازی در پسودوموناس آئروژینوزا جداسده از زخم سوختگی

فاطمه کمانی^۱، تقی زهرایی صالحی^{۲*}

چکیده

سابقه و هدف: پسودوموناس آئروژینوزا از عوامل ایجادکننده عفونت‌های اکتسابی بیمارستانی در سراسر جهان می‌باشد. به‌ویژه سویه‌های تولیدکننده‌ی متالوبتالاکتاماز اغلب به چندین نوع از آنتی بیوتیک‌ها مقاوم می‌باشند؛ بنابراین هدف از مطالعه حاضر شناسایی مولکولی ژن‌های متالوبتالاکتاماز در ایزوله‌های پسودوموناس آئروژینوزا جداسده از بیماران دچار سوختگی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه به‌صورت توصیفی-مقطعی و از مهر تا اسفند ۱۳۹۳ بر روی ۵۵ نمونه‌ی غیرتکراری به‌دست آمده از بیماران دچار سوختگی در تهران انجام گردید. روش PCR چندگانه به‌منظور شناسایی ژن‌های GIM، SPM، VIM، IMP-۱ و SIM-۱ انجام شد.

نتایج: میانگین سنی افراد مورد مطالعه، ۴۹ سال با محدوده سنی ۱۵ تا ۸۹ سال بود. ۷۸/۲ درصد بیماران (۴۳ نفر) را مردان و ۲۱/۸ درصد (۱۲ نفر) را زنان تشکیل دادند. توزیع ژن‌های GIM، SPM، VIM، IMP-۱ و SIM-۱ به‌ترتیب برابر ۲ (۳/۶۳ درصد)، ۰ (۰/۰۰ درصد)، ۲ (۳/۶۳ درصد)، ۲ (۳/۶۳ درصد) و ۰ (۰/۰۰ درصد) بود.

نتیجه‌گیری: پسودوموناس آئروژینوزا تولیدکننده MBL به‌عنوان تهدیدی در بیماران دچار سوختگی محسوب می‌شود و یکی از نگرانی‌های پزشکان جهت درمان این بیماران می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: بیماران دچار سوختگی، پسودوموناس آئروژینوزا، ژن‌های متالوبتالاکتاماز

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، ساوه، ایران
۲. استاد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

* نویسنده مسئول: تقی زهرایی صالحی، خیابان آزادی، دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی، تهران

پست الکترونیک:

Tsalehi@ut.ac.ir

دریافت: ۹۴/۶/۱۳

اصلاحیه: ۹۴/۷/۵

ویراستاری: ۹۴/۸/۳۰

◀ **استناد:** کمانی، فاطمه؛ زهرایی صالحی، تقی. شناسایی مولکولی ژن‌های متالوبتالاکتامازی در پسودوموناس آئروژینوزا جداسده از زخم سوختگی. مجله طب پیشگیری طبری، پاییز ۱۳۹۴؛ ۱(۲): ۵۳-۶۰.

پسودوموناس آئروژینوزا باسیلی گرم منفی، هوازی اجباری، متحرک و فاقد اسپور است (۱). این ارگانسیم یک پاتوژن فرصت طلب محسوب می‌گردد که در افراد دارای نقص در عملکرد طبیعی سیستم ایمنی مانند سوختگی، استفاده‌کنندگان از کاتترهای داخل وریدی یا ادراری، بیماران دچار نوتروپنی، مبتلایان به ایدز و سرطان به‌صورت عامل بیماری‌زا عمل می‌کند (۲،۳). این باکتری تقریباً هر اندامی از بدن را درگیر می‌سازد و سبب طیف وسیعی از بیماری‌ها مانند: عفونت زخم و سوختگی، مننژیت، عفونت ادراری، اوتیت، عفونت چشم، عفونت تنفسی، عفونت‌های استخوان و مفاصل، عفونت‌های معدی روده‌ای، سپسیس، تب، اندوکاردیت، پنومونی مرتبط با ونتیلاتور می‌شود (۴). همچنین این باکتری یکی از عوامل مهم عفونت‌های مزمن ریوی و مرگ‌ومیر در افراد با بیماری سیستمیک فیبروزیس می‌باشد (۵). پسودوموناس آئروژینوزا یکی از عوامل مهم در ایجاد عفونت‌های ناشی از بیمارستان می‌باشد. دارا بودن فاکتورهای ویروانس متعدد و مقاوم به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها، دزنفکتانت‌ها و گندزداها کلید موفقیت و بقای این ارگانسیم در محیط و بیماری‌زایی آن می‌باشد (۶). درمان عفونت‌های ایجادشده توسط پسودوموناس آئروژینوزا به‌دلیل مقاومت بالای این ارگانسیم بسیار مشکل است (۷). مقاومت در این ارگانسیم می‌تواند با منشأ کروموزوم (ذاتی) و یا پلاسمید (اکتسابی) باشد که در این حالت به سهولت در بین سویه‌ها و گونه‌های مختلف حتی بین جنس‌های مختلف باکتریایی به‌صورت افقی منتقل می‌شود که اصطلاحاً انتقال افقی ژن (Horizontal Gene Transfer: HGT) می‌گویند. مشکل اساسی در درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری ظهور سویه‌هایی با مقاومت چندگانه دارویی (Multi Drug Resistance: MDR) می‌باشد. عفونت‌های ناشی از میکروارگانسیم‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک به‌طور چشمگیری منجر به طولانی شدن زمان بستری، افزایش میزان مرگ‌ومیر، بالا رفتن هزینه درمان در مقایسه با میکروارگانسیم‌های حساس به آنتی‌بیوتیک می‌گردد (۸-۱۰).

بتالاکتامازها آنزیم‌هایی هستند که با هیدرولیز حلقه بتالاکتام آنتی‌بیوتیک‌ها، سبب غیرفعال شدن آن‌ها می‌شوند (۱۱). آمبلا (Ambler) این آنزیم‌ها را براساس ساختمان اولیه‌شان به چهار گروه (A-D) تقسیم‌بندی نمود که نوع B، متالوبتالاکتاماز (MBLs) می‌باشد. این آنزیم‌ها توانایی هیدرولیز طیف وسیعی از بتالاکتامازها از جمله: سفالوسپورین‌ها، کارباپنم‌ها و پنی‌سیلین‌ها را دارند. MBLs برای انجام فعالیت خود نیاز به فلز روی به‌عنوان کوفاکتور دارند (۱۲،۱۳). متالوبتالاکتامازها براساس ساختار مولکولی به انواع مختلفی تقسیم‌بندی می‌شوند که عبارتند از: DIM ، KHM، SIM، NDM، GIM، SPM، IMP و VIM. در این میان تیپ IMP در سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزا غالب است؛ اما SPM و SIM سبب بروز مقاومت به طیف گسترده‌ای از آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شوند.

ژن‌های رمزکننده MBLs بر روی اینتگرون کلاس یک و پلاسمید قابل انتقال قرار دارد؛ بنابراین مطالعه‌ی این آنزیم‌ها جهت شناسایی سریع سویه‌های مقاوم برای جلوگیری از گسترش آن‌ها بسیار ضروری است (۱۴،۱۵). هدف از مطالعه حاضر ردیابی ژن‌های MBLs در پسودوموناس آئروژینوزا جداشده از بیماران دچار سوختگی به روش PCR چندگانه (Multiplex PCR) می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جامعه مورد مطالعه و ایزولاسیون باکتری

در این مطالعه توصیفی-مقطعی که در طی مهر تا اسفند ۱۳۹۳ انجام شد، تعداد ۵۵ نمونه‌ی غیرتکراری و به‌صورت کاملاً تصادفی از ترشحات و زخم افراد دارای سوختگی از بیمارستان‌های مختلف در سطح شهر تهران، جمع‌آوری گردید. تمامی نمونه‌ها به آزمایشگاه تحقیقاتی و پژوهشی گروه میکروبی‌شناسی پاسارگاد منتقل شدند. در آزمایشگاه نمونه‌های به‌دست آمده بر روی محیط بلاد آگار (Blood Agar)، مک‌کانکی آگار (Macconkey Agar) و ستریمید آگار (Cetrimide Agar) (مرک، آلمان) کشت داده و پس

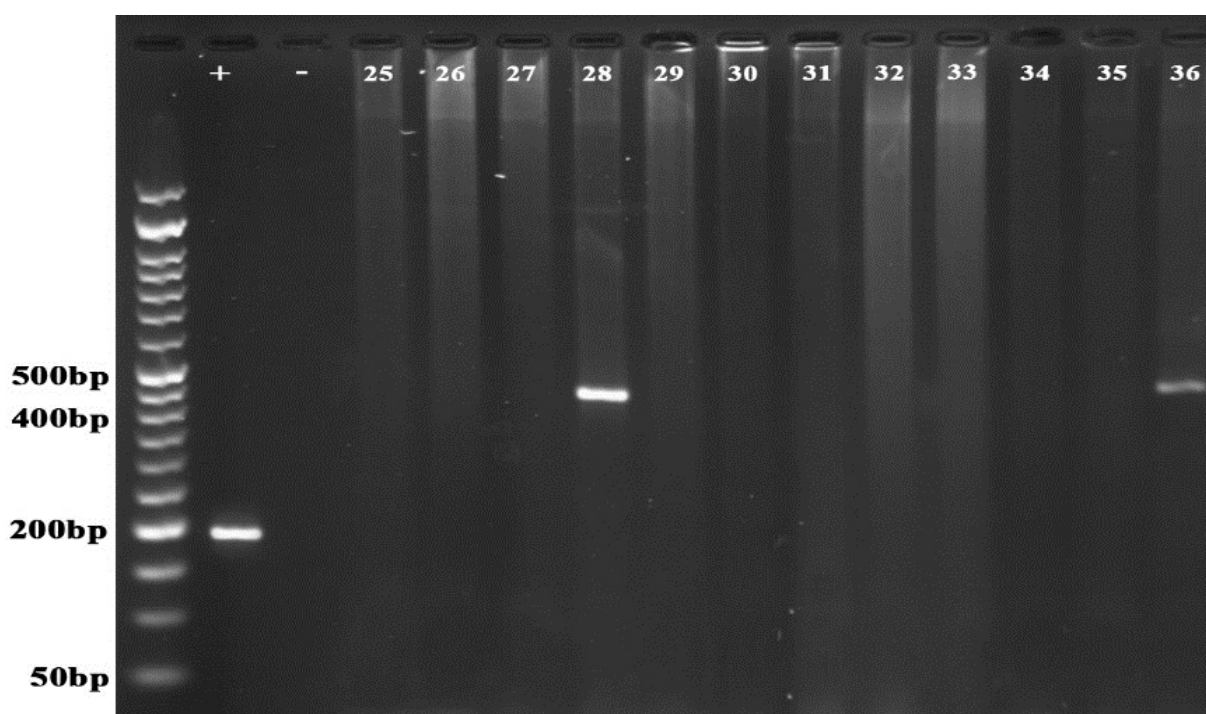
ردیابی ژن‌های کدکننده MBLs توسط Multiplex-PCR

نتایج حاصل از آزمون Multiplex-PCR به‌منظور تکثیر ژن‌های کدکننده MBLs (IMP، SPM، GIM-۱، VIM و SIM-۱) بر روی تمامی ایزوله‌های پسودوموناس آئروژینوزا شناسایی شده با استفاده از آزمون‌های روتین و استاندارد بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی نشان داد که تنها دو ایزوله (۳/۶۳ درصد) برای ژن‌های IMP و SPM و دو نمونه (۳/۶۳ درصد) نیز برای ژن GIM-۱ مثبت بود؛ درحالی که هیچ‌کدام از جدایه‌های تحت مطالعه (صفر درصد) برای ژن‌های VIM و SIM-۱ مثبت نبودند. در نتیجه روش PCR چندگانه حضور چهار سویه (۷/۲۷ درصد) حمل‌کننده ژن‌های کدکننده MBLs را در بین جدایه‌های به‌دست آمده اثبات کرد. نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات M-PCR در تصاویر ۱ و ۲ نشان داده شده است.

نتایج

ویژگی افراد تحت مطالعه و جداسازی باکتری

در مطالعه پیش رو میانگین سنی افراد تحت مطالعه، ۴۹ سال با محدوده سنی ۱۵ تا ۸۹ سال می‌باشد. نمونه‌ها از گروه‌های مختلف سنی شامل: ۲۰-۳۹ سال ۱۳ نفر (۱۳ درصد)، ۴۰-۵۹ سال ۳۱ نفر (۴/۵۶ درصد)، ۶۰-۸۹ سال ۷ نفر (۷/۱۲ درصد) و افراد کمتر از ۱۵ سال ۴ نفر (۳/۷ درصد) جمع‌آوری گردید. ۴۳ بیمار (۷۸/۲ درصد) مرد و ۱۲ بیمار را (۲۱/۸ درصد) زنان دادند. براساس آزمون‌های استاندارد بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی، از ۵۵ نمونه به‌دست آمده از زخم و ترشحات سوختگی تعداد ۵۵ سویه پسودوموناس آئروژینوزا به‌دست آمد. این نتایج نشان داد که تمامی افراد تحت مطالعه (۱۰۰ درصد) که مشکوک به عفونت با پسودوموناس آئروژینوزا بودند از نظر وجود این ارگانیسم مثبت بودند.

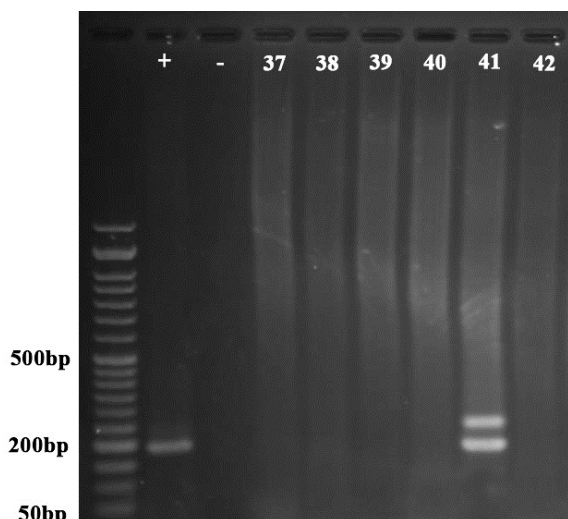


شکل ۱: نتایج آزمون Multiplex-PCR جهت تکثیر ژن‌های GIM-۱، VIM و SIM-۱. تمامی ایزوله‌ها از نظر وجود ژن‌های SIM-۱ و VIM منفی بودند؛ اما تنها دو نمونه (سویه‌های ۲۸ و ۳۶) حامل ژن GIM-۱ بودند (طول محصول ۴۷۷ bp). DNA مارکر ۵۰ bp (سیناژن، ایران)، کنترل مثبت پسودوموناس آئروژینوزا ATCC ۲۷۸۵۳ و کنترل منفی اسیتوباکتر بومانی ATCC ۱۹۶۰۶ بود.

بحث و نتیجه گیری

سوءاستفاده و استفاده خودسرانه، نادرست و زیاد از آنتی‌بیوتیک‌ها در پزشکی، دامپزشکی و کنترل آفات و اصلاحات گیاهی سبب بروز سویه‌های مقاوم شده است (۱۶). این مقاومت به‌وسیله‌ی القای آنزیم‌های غیرفعال‌کننده آنتی‌بیوتیک‌ها (مانند: بتالاکتامازها، سفالوسپورینازها، کارباپنم‌ها و...)، جهش در ژن‌های کدکننده پروتئین‌های غشای خارجی، تغییر در گیرنده یا محل اثر آنتی‌بیوتیک‌ها رخ می‌دهد. تولید بتالاکتاماز یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های مقاومت در باکتری‌ها است. متالوبتالاکتامازها به‌عنوان یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های دخیل در ایجاد مقاومت به ترکیبات ضد میکروبی مانند: کارباپنم‌ها و سفالوسپورین‌های نسل سوم به‌شمار می‌روند (۱۷، ۱۸).

در مطالعه‌ی پیش رو، چهار سویه (۷/۷۲ درصد) از نظر تکثیر ژن‌های کدکننده MBLs در Multiplex-PCR، مثبت در نظر گرفته شدند که دو نمونه از نظر IMP و SPM و در دو نمونه دیگر GIM-۱ مثبت بود. همچنین تمامی ۵۵ ایزوله (۱۰۰ درصد) برای ژن‌های VIM-۱ و SIM-۱ منفی بودند. در مطالعه‌ای مشابه در کشورهای کره و ایتالیا، متالوبتالاکتاماز تیپ VIM نسبت به سایر MBLs‌ها از فراوانی بیشتری برخوردار بود (۱۹، ۲۰). در این مطالعه تنها ۷/۵ درصد نمونه‌ها متالوبتالاکتاماز مثبت بودند که خوشبختانه آمار پایینی است. این اختلاف می‌تواند در نتیجه‌ی محدودیت در مصرف آنتی‌بیوتیک و نظارت‌های شدید درمانی، اختلاف جغرافیایی و جامعه‌ی مورد پژوهش باشد. فراوانی ژن‌های MBLs در مطالعه لوزارو (Luzzaro) و همکاران (۲۱) برابر ۰/۷ درصد گزارش گردیده که تمام آن‌ها حامل ژن VIM بودند. در پژوهش یاتسویانگی (Yatsuyanagi) و همکاران (۲۲) بر روی ۴۲ ایزوله‌ی پسودوموناس آئروژینوزا که در آزمون DDST (Double-Disk Synergy Test)، فنوتیپ MBLs مثبت را نشان دادند. تعداد ۸ و ۲۴ سویه به‌ترتیب حامل ژن‌های VIM و IMP بودند. این نتایج همچنین با



شکل ۲: نتایج آزمون Multiplex-PCR جهت تکثیر ژن‌های IMP و SPM. تنها یک نمونه (سویه‌ی ۴۱) حامل ژن‌های مذکور بود (طول محصولات: ۱۸۸ bp برای IMP و ۲۷۱ bp برای DNA SPM). ۵۰ bp (سینازن، ایران)، کنترل مثبت پسودوموناس آئروژینوزا ATCC ۲۷۸۵۳ و کنترل منفی اسپینتوباکتر بومانی ATCC ۱۹۶۰۶ بود.

نتایجی که توسط خسروی و همکاران (۲۳) در اهواز بر روی سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزای جدا شده از عفونت‌های سوختگی صورت گرفته است، مطابقت دارد. در مطالعه‌ی شاهچراغی و همکارانش (۲۴) بر روی سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزای جدا شده از بیمارستان سوانح و سوختگی کرمان، هیچ سویه‌ی مولد MBL مشاهده نشد که به نتیجه‌ی ما نزدیک است و می‌تواند بیانگر مقاومت از طریق سایر ژن‌های MBLs و یا در سویه‌هایی که مولد MBL نیستند، وجود Efflux Pumps، تغییر در نفوذپذیری غشا مانند فقدان OprD و یا وجود بتالاکتاماز AmpC کروموزومی باشد. بررسی‌های سپهری و همکاران (۲۵) در بیمارستان سوختگی مطهری نشان داد که ۱۰۰ درصد سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزا تولیدکننده بتالاکتاماز بوده و در ۹۷/۵ درصد سویه‌ها، تولید بتالاکتاماز با واسطه‌ی پلاسمید صورت می‌گیرد. از این رو ژن‌های کدکننده MBLs می‌توانند به سرعت در میان گونه‌های مختلف باسیل‌های گرم منفی منتشر شوند و انتشار ژن‌های MBLs با مصرف آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف همچون سفالوسپورین‌ها و کارباپنم‌ها افزایش می‌یابد.

راهکار درمانی در بیماری‌های عفونی، پزشکان را در تجویز رژیم صحیح آنتی‌بیوتیکی یاری داده و در کنترل انتشار ژن‌های مقاومتی و بروز سویه‌های مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک (MDR) مؤثر است. همچنین نتایج مطالعه پیشرو پیشنهاد می‌کند، به‌منظور جلوگیری از افزایش مقاومت و شکست در درمان، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی طبق استانداردهای CLSI به‌طور دقیق تعیین شود تا بهترین درمان جهت کاهش هزینه درمانی، کاهش شکست درمانی و جلوگیری از ظهور سویه‌های مقاوم اتخاذ گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند که از همکاران و پرسنل آزمایشگاه تحقیقاتی میکروبیولوژی پاسارگاد تقدیر و تشکر نمایند.

References

- Franklin MJ, Nivens DE, Weadge JT, Howell PL. Biosynthesis of the pseudomonas aeruginosa extracellular polysaccharides, alginate, pel, and psl. *Front Microbiol* 2011; 2(167):2-16.
- Lari AR, Alaghebandan R. Nosocomial infections in an Iranian burn care center. *Burns* 2000; 26(8):737-740.
- Church D, Elsayed S, Reid O, Winston B, Lindsay R. Burn wound infections. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19(2):403-434.
- Bielecki A, Glik J, kaweci M, Martins dos Santos VA. Towards understanding pseudomonas aeruginosa burn wound infections by profiling gene expression. *Biotechnol Lett* 2008; 30(5):777-790.
- Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ. Cystic fibrosis. *N Engl J Med* 2005; 352(19):1992-2001.
- Rodrigues AC, Chang MR, Nobrega GD, Rodrigues MS, Carvalho NC, Gomes BG, et al. Metallo- β -lactamase and genetic diversity of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units in Campo Grande, MS, Brazil. *Braz J Infect Dis* 2011; 15(3):195-199.
- Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect* 2000; 2(9):1051-1060.
- Khosravi AD, Mihani F. Detection of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients in Ahwaz, Iran. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 60(1):125-128.
- 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):3129-3135.
- Cheng X, Wang P, Wang Y, Zhang H, Tao C, Yang W, et al. Identification and distribution of the clinical isolates of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying metallo-beta-lactamase and/or class I integron genes. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2008; 28(3):235-238.
- Bahar MA, Jamali S, Samadikuchaksaraei A. Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains carry metallo-beta-lactamase gene bla(VIM) in a level I Iranian burn hospital. *Burns* 2010; 36(6):826-830.

یکی از مهم‌ترین مشکلات بهداشتی و درمانی در بسیاری از نقاط دنیا ضایعات سوختگی می‌باشد. بیماران مبتلا به این ضایعات در معرض خطر بالا برای کسب عفونت‌های بیمارستانی هستند؛ زیرا زخم‌های سوختگی مکان استقرار باکتری‌های فرصت‌طلب از جمله *Pseudomonas* آئروژینوزا می‌باشد؛ بنابراین با توجه به اهمیت ارگانسیم‌های تولیدکننده ژن‌های مقاومتی مانند متالوبتالاکتاماز و ایجاد سویه‌های مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک (MDR)، مقاومت آنتی‌بیوتیکی معضل جدی و روبه پیشرفتی است که کنترل آن ضروری بوده و برای جایگزینی آنتی‌بیوتیک‌های مناسب در جهت کاهش شیوع این ژن‌ها، الزاماً به تولید آنتی‌بیوتیک‌های جدید و مناسب نیاز خواهد بود. وجود سویه‌های مقاوم می‌تواند هشدار در جهت دستورالعمل‌های درمانی حاضر باشد؛ بنابراین انجام آزمون‌های تشخیصی در شناسایی سویه‌های مقاوم و پیشنهاد

12. Viedma E, Juan C, Villa J, Barrado L, Orellana MA, Sanz F, et al. VIM-2-producing multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST175 Clone, Spain. *Emerg Infect Dis* 2012; 18(8):1235-1241.
13. Kitao T, Tada T, Tanaka M, Narahara K, Shimojima M, Shimada K, et al. Emergence of a novel multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain producing IMP-type metallo- β -lactamases and AAC(6')-Iae in Japan. *Int J Antimicrob Agents* 2012; 39(6):518-521.
14. Hota S, Hirji Z, Stockton K, Lemieux C, Dedier H, Wolfaardt G, et al. Outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* colonization and infection secondary to imperfect intensive care unit room design. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2009; 30(1):25-33.
15. Liew YX, Tan TT, Lee W, Ng JL, Chia DQ, Wong GC, et al. Risk factors for extreme-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections in patients with hematologic malignancies. *Am J Infect Control* 2013; 41(2):140-144.
16. Japoni A, Alborzi A, Kalani M, Nasiri J, Hayati M, Farshad S. Susceptibility patterns and cross-resistance of antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in the South of Iran. *Burns* 2006; 32(3):343-347.
17. Yousefi S, Farajnia S, Nahaei MR, Akhi MT, Ghotaslou R, Soroush MH, et al. Detection of metallo- β -lactamase-encoding genes among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in northwest of Iran. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; 68(3):322-325.
18. Rodríguez-Baño J, Navarro MD, Romero L, Martínez-Martínez L, Muniain MA, Perea EJ, et al. Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in nonhospitalized patients. *J Clin Microbiol* 2004; 42(3):1089-1094.
19. Giani T, Marchese A, Coppo E, Kroumova V, Rossolini GM. VIM-1-Producing *Pseudomonas mosselii* isolates in Italy, Predating Known VIM-Producing Index Strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56(4):2216–2217.
20. Lee K, Yong D, Yum JH, Lim YS, Bolmstrom A, Qwarnstrom A, et al. Evaluation of Etest MBL for detection of blaIMP-1 and blaVIM-2 allele-positive clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* 2005; 43(2):942-944.
21. Luzzaro F, Endimiani A, Docquier JD, Mugnaioli C, Bonsignori M, Amicosante G, et al. Prevalence and characterization of metallo-beta-lactamases in clinical isolates of *pseudomonas aeruginosa*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 48(2):131-135.
22. Yatsuyanagi J, Saito S, Harata S, Suzuki N, Ito Y, Amano K, et al. Class 1 integron containing metallo-beta-lactamase gene blaVIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains isolated in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(2):626-628.
23. Khosravi AD, Mihani F. Detection of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients in Ahwaz, Iran. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 60(1):125–128.
24. Shahcheraghi F, Nikbin VS, Feizabadi MM. Identification and genetic characterization of metallo-beta-lactamase-producing strains of *pseudomonas aeruginosa* in Tehran, Iran. *New Microbiol* 2010; 33(3):243-248.
25. Sepehri Seresht S, Najar Pirayeh SH, Satari M, Ahangarzadeh M, Ahangarzadeh Rezai M. Production of plasmid-mediated beta-lactamases in *pseudomonas Aeruginosa* isolated from burn patients. *Hakim* 2007; 10(1):61-65. (Persian)
26. Ellington MJ, Kistler J, Livermore DM, Woodford N. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59(2):321-322.
27. Fallah F, Noori M, Hashemi A, Goudarzi H, Karimi A, Erfanimesh S, et al. Prevalence of bla NDM, bla PER, bla VEB, bla IMP, and bla VIM Genes among *Acinetobacter baumannii* Isolated from Two Hospitals of Tehran, Iran. *Scientifica (Cairo)* 2014; 2014:1-6.