



تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و بررسی تولید بتالاکتاماز سویه‌های پseudomonas آئروژینوزا جدا

شده از نمونه‌های کلینیکی بیمارستان‌های کاشانی و هاجر شهرکرد در سال ۱۳۸۷

مانا شجاع‌پور^۱، مجید ولیدی^۲، لاله شریعتی^۳، علی کریمی^۲، بهنام زمان‌زاد^{۲*}

^۱ مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک

^۲ مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد

^۳ گروه پزشکی مولکولی، دانشکده فن‌آوری نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

زمینه: پseudomonas آئروژینوزا مهم‌ترین عامل عفونت‌های بیمارستانی در بیماران بستری به مدت ۱۰ روز یا بیشتر می‌باشد، همچنین مهم‌ترین عامل عفونت زخم ناشی از سوختگی به‌شمار می‌رود. حدود ۷۵ درصد موارد مرگ در بیماران سوخته به‌دلیل عفونت زخم و یا سپتی‌سمی متعاقب آن است. با مصرف کلینیکی آنتی‌بیوتیک‌ها سویه‌های پseudomonas آئروژینوزا بیمارستانی دارای مقاومت چندگانه نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها (MDR) در سراسر جهان به‌طور فزاینده‌ای انتشار یافته است. این مطالعه با هدف تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی و بررسی وجود بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBLs: Extended-Spectrum Beta Lactamases) سویه‌های پseudomonas آئروژینوزا جدا شده از نمونه‌های کلینیکی انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ۱۷۵ سویه پseudomonas آئروژینوزا جدا شده از نمونه‌های کلینیکی بر طبق روش‌های استاندارد کشت و تعیین هویت گردیدند. سپس ایزوله‌ها از نظر مقاومت آنتی‌بیوتیکی به‌روش دیسک دیفیوژن و طبق معیارهای پیشنهادی استانداردهای آزمایشگاهی بالینی (CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute) مورد بررسی قرار گرفتند. جهت غربال‌گری اولیه ارگانیزم‌های تولیدکننده‌ی ESBL میزان مقاومت این سویه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک سفنازیدیم بررسی شد. سپس ایزوله‌های مقاوم به‌منظور تأیید نهایی تولید ESBL به‌روش combined disk method مورد مطالعه قرار گرفتند.

یافته‌ها: در این مطالعه میزان مقاومت پseudomonas به آنتی‌بیوتیک‌های جت‌تامایسین، آمیکاسین، سیپروفلوکساسین، سفنازیدیم، تیکارسلین، تیکارسلین/کلولانیک اسید، ایمپنم، سفپیم، پلی‌میکسین B به‌ترتیب ۶۸/۶ درصد، ۶۷/۴ درصد، ۷۷/۷ درصد، ۶۸/۶ درصد، ۶۴ درصد، ۶۸/۶ درصد، ۴۸ درصد، ۵۲/۲ درصد، ۵/۱ درصد بود. در تست غربال‌گری اولیه تعداد ۱۲۰ (۶۸/۶ درصد) ایزوله پseudomonas آئروژینوزا به آنتی‌بیوتیک سفنازیدیم (تست فنوتیپی اولیه) مقاومت نشان دادند. از ۱۲۰ ایزوله مقاوم به سفنازیدیم، در روش combined disk method ۶۶ ایزوله (۵۵ درصد) فنوتیپ ESBL مثبت بودند و ۵۴ ایزوله (۴۵ درصد) فنوتیپ منفی بودند.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج این مطالعه، پلی‌میکسین B بیشترین فعالیت ضدپseudomonاسی را در میان عوامل ضد میکروبی بکار رفته نشان داد. از طرفی ارگانیزم‌هایی که حامل ژن‌های ESBL می‌باشند، باعث افزایش مرگ و میر می‌شوند. بنابراین تشخیص‌های درست آزمایشگاهی برای جلوگیری از شکست درمان ناشی از انتخاب نامناسب آنتی‌بیوتیک بسیار حائز اهمیت است.

واژگان کلیدی: آنتی‌بیوتیکی، روش دیسک ترکیبی، ESBLs، پseudomonas آئروژینوزا

دریافت مقاله: ۸۸/۱۲/۱۱ - پذیرش مقاله: ۸۹/۴/۲۶

* شهرکرد، گروه میکروب و ایمنی‌شناسی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد

E-mail: bzamanzad@yahoo.com

مقدمه

پseudomonas آئروژینوزا یکی از رایج‌ترین گونه‌های باکتریایی مسئول عفونت‌های بیمارستانی می‌باشد (۱). علیرغم پیدایش طیف وسیعی از عوامل ضدمیکروبی واجد فعالیت ضدپseudomonas، عفونت‌های تهدیدکننده حیات به‌وسیله پseudomonas آئروژینوزا سبب مرگ و میر بالایی در بیماران بستری می‌گردد (۲). این باکتری به‌فراوانی در طبیعت پخش شده و از محیط بیمارستان، وسایل پزشکی، پرستاران و سایر پرسنل بیمارستانی جدا می‌شود (۳). با مصرف بالینی آنتی‌بیوتیک‌ها سویه‌های پseudomonas آئروژینوزا بیمارستانی دارای مقاومت چندگانه نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها (MDR) در سراسر جهان به‌طور فزاینده‌ای انتشار یافته است (۴).

مقاومت آنتی‌بیوتیکی در پseudomonas آئروژینوزا به‌طریق مکانیسم‌های مختلفی رخ می‌دهد، از جمله تولید بتالاکتامازهای Amp C، کسب بتالاکتامازهای پلاسמידی یا ترانسپوزون‌ها، کاهش برداشت آمینوگلیکوزیدها از طریق غشای خارجی و سیتوپلاسمی، تغییر در DNA ژیراز (در مورد مقاومت به کینولون‌ها)، از دست دادن پورین D2 (منجر به مقاومت به ای‌می‌پنم) می‌باشد. همچنین مقاومت دارویی چندگانه مرتبط با سیستم‌های Multi-drug efflux می‌باشد (۵ و ۶).

با توجه به اینکه شیوع مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در بیمارستان‌ها فراوان می‌باشد. از طرفی پseudomonas آئروژینوزا از مهم‌ترین عوامل ایجادکننده عفونت‌های بیمارستانی است. همچنین با توجه به اینکه تحقیقاتی که در مورد این پدیده پیچیده در یک مقطع زمانی در منطقه‌ای انجام می‌شود به زمان‌ها و مکان‌های دیگر قابل تعمیم نیست.

بنابراین ضروریست همه پزشکان و سایر افرادی که با درمان سر و کار دارند پیوسته از وضعیت مقاومت دارویی خود اطلاع کامل داشته باشد تا از اتلاف وقت، مصرف بی‌نتیجه دارو و حتی بروز مقاومت بیشتر در باکتری‌ها جلوگیری کرد. این مطالعه به‌منظور تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و بررسی وجود بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در سویه‌های پseudomonas آئروژینوزا جدا شده از نمونه‌های کلینیکی بیمارستان‌های هاجر و کاشانی شهرکرد انجام شد.

مواد و روش کار

نمونه‌ها شامل ۱۷۵ مورد ایزوله پseudomonas آئروژینوزا غیرتکراری و متناوب بودند که طی یک دوره ۷ ماه از نمونه‌های بالینی (زخم، ادرار، خلط و خون) بیماران بیمارستان‌های آموزشی شهرکرد جدا شدند. نمونه‌ها بر اساس تست اکسیداز مثبت، تولید پیگمان در محیط مولر هیتون آگار، تست OF (Oxidation Fermentation) هوازی مثبت و بی‌هوازی منفی، وضعیت غیرتخمیری در محیط Triple TSI (Sugar Iron Agar) تعیین هویت شدند.

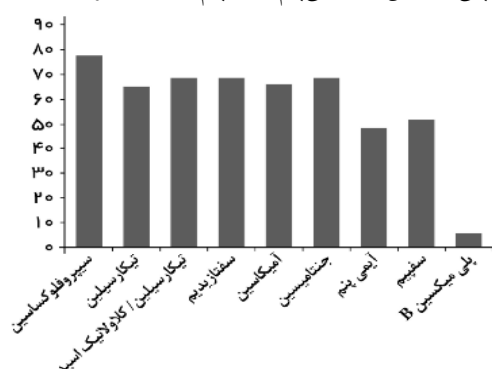
ایزوله‌های پseudomonas آئروژینوزا جهت آزمایشات بعدی در محیط نگهدارنده (محیط کشت مایع حاوی گلیسرول) به‌صورت لیوفیلیزه در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت بررسی مقاومت باکتری‌های جدا شده از روش استاندارد کربی-بوئر (دیسک دیفیوژن) استفاده گردید. پس از تهیه سوسپانسیون میکروبی معادل کدورت نیم مک فارلند، این سوسپانسیون به‌وسیله سوآپ استریل به محیط مولر هیتون آگار تلقیح گردید. سپس دیسک‌های

به سفتازیدیم) تهیه شده از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی تهران و *Escherichia coli* ATCC 35218 (حساس به سفتازیدیم) تهیه شده از دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به‌عنوان سویه‌های کنترل استفاده شد.

یافته‌ها

در این مطالعه توصیفی-تحلیلی که به‌منظور تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *Pseudomonas aeruginosa* آئروژینوزا جدا شده از نمونه‌های کلینیکی (ترشحات زخم، ادرار، خلط، خون) صورت گرفت، ۱۷۵ سویه باکتری *Pseudomonas aeruginosa* آئروژینوزا از نمونه‌های بالینی جدا گردید. که از این میان ۵ سویه *Pseudomonas aeruginosa* آئروژینوزا از ۱۰۱ مورد (۵۷/۷ درصد) ترشحات زخم، ۳۸ مورد (۲۱/۷ درصد) نمونه ادرار، ۲۸ مورد (۱۶ درصد) نمونه خلط و ۸ مورد (۴/۶ درصد) نمونه خون مجزا گردیدند. نمونه‌ها از ۹۸ بیمار بستری در بخش (۵۶ درصد) و ۷۷ بیمار سرپایی (۴۴ درصد) اخذ گردید. کلیه سویه‌های *Pseudomonas aeruginosa* جدا شده از نمونه‌های بالینی از نظر الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی به‌روش دیسک دیفیوژن در محیط مولر هیتون آگار مورد بررسی قرار گرفتند.

در شکل ۱ در یک نمای کلی میزان مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها نشان داده شده است. کمترین میزان مقاومت در پلی‌میکسین B، ایمپنم و سفیم مشاهده گردید.



شکل ۱) نمودار میزان مقاومت به ۹ آنتی‌بیوتیک در سویه‌های *Pseudomonas aeruginosa*

آنتی‌بیوتیکی در سطح محیط کشت با رعایت فاصله استاندارد قرار داده شده و پلیت‌ها در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴-۱۸ ساعت انکوبه گردیدند.

پس از اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد، وضعیت مقاومت و حساسیت ایزوله‌ها با جدول استاندارد بررسی شدند. آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمایش شامل: جنتامایسین، آمیکاسین، سیپروفلوکساسین، تیکارسیلین، تیکارسیلین / کلاولانیک اسید، ایمپنم، سفیم، سفتازیدیم، پلی‌میکسین B (تهیه شده از شرکت Himedia، هندوستان) بودند. از باکتری *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 به‌عنوان سویه کنترل استفاده گردید. همچنین جهت بررسی حضور بتا لاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBLs: Extended-Spectrum Beta Lactamases) در سویه‌های *Pseudomonas aeruginosa* آئروژینوزا جدا شده از نمونه‌های بالینی از روش (Combination Disk Method) دیسک سفتازیدیم + دیسک ترکیبی سفتازیدیم کلاولانیک اسید) استفاده شد (تهیه شده از شرکت Mast انگلستان) (۷).

به این ترتیب که ابتدا سوسپانسیونی از باکتری معادل با کدورت نیم مک فارلند تهیه شد. سپس بر روی محیط مولر هیتون آگار کشت داده شد. بعد از تلقیح سوسپانسیون میکروبی روی محیط کشت، دیسک‌های سفتازیدیم و سفتازیدیم-کلاولانیک اسید به فاصله ۲۰ میلی‌متر از یکدیگر روی محیط قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت انکوبه کردن در دمای ۳۵°C، قطر هاله‌ی عدم رشد هر یک از دیسک‌ها اندازه گرفته شد، در صورتی‌که قطر هاله عدم رشد باکتری اطراف دیسک ترکیبی ۵ میلی‌متر بیشتر از قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک منفرد همان آنتی‌بیوتیک باشد، باکتری واجد بتا لاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBLs) می‌باشد. از *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (مقاوم

بحث

پدیده مقاومت دارویی بلافاصله پس از چند سال از مصرف انبوه آنتی بیوتیک ها در جوامع انسانی شناخته شده است و به صورت های تکی یا چند دارویی دیده می شود (۸). pseudomonas آئروژینوزا مقاومت زیادی به اکثر آنتی بیوتیک ها دارد. مقاومت آنتی بیوتیکی در این ارگانیسم با سرعت زیادی در حال افزایش است.

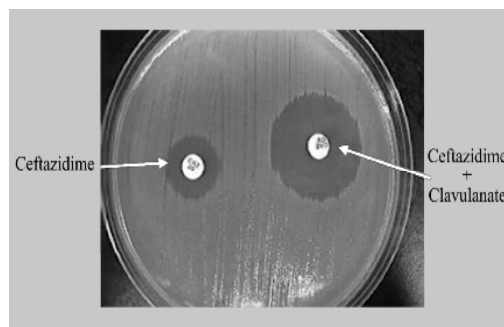
نتایج حاصل از مطالعه ما نیز نشان داد که درصد بالایی از سویه های ایزوله شده در برابر آنتی بیوتیک های مورد مطالعه مقاومت دارند، به طوریکه در این مطالعه میزان مقاومت pseudomonas آئروژینوزا به آنتی بیوتیک های جنتامایسین، آمیکاسین، سیپروفلوکساسین، سفنازیدیم، تیکارسیلین، تیکارسیلین / کلانولانیک اسید، ایمپنم، سفپیم، پلی میکسین B به ترتیب ۶۸/۶ درصد، ۶۷/۴ درصد، ۷۷/۷ درصد، ۶۸/۶ درصد، ۶۴ درصد، ۶۸/۶ درصد، ۴۸ درصد، ۵۲/۲ درصد، ۵/۱ درصد می باشد.

در مورد مقاومت دارویی pseudomonas آئروژینوزا های جدا شده از نمونه های بالینی تاکنون مطالعات زیادی صورت گرفته است. نتایج این مطالعات بر حسب زمان و مکان مطالعه متفاوت است. در اینجا به بیان چند مطالعه که در سال های اخیر انجام گرفته و مقایسه آنها با نتایج به دست آمده در این مطالعه می پردازیم.

در مطالعه انجام شده توسط دکتر وحدت و همکاران در طی سال ۲۰۰۳ میلادی میزان مقاومت به جنتامایسین ۵۶ درصد بوده که با نتیجه به دست آمده در مطالعه ما مطابقت داشت (۹). مطالعات گذشته نگر نیز در مورد مقاومت به این آنتی بیوتیک روند رو به افزایشی را نشان می دهند (۱۰ و ۱۱). بر اساس مطالعات انجام شده در فرانسه، کره و بلغارستان میزان مقاومت به آمیکاسین بین ۶۴/۵ - ۱۰/۶ درصد برآورد

با توجه به نتایج به دست آمده میزان مقاومت در سویه های pseudomonas آئروژینوزا جدا شده از بیماران بستری بیشتر از بیماران سرپایی می باشد.

در تست فنوتیپی تأییدی به روش (combination disk method) کلیه ایزوله های مقاوم به سفنازیدیم به منظور تعیین فراوانی فنوتیپ ESBL، بررسی شدند. از ۱۲۰ ایزوله مقاوم به سفنازیدیم، ۶۶ ایزوله (۵۵ درصد) فنوتیپ ESBL مثبت بودند و ۵۴ ایزوله (۴۵ درصد) فنوتیپ منفی بودند. در مجموع از ۱۷۵ ایزوله pseudomonas آئروژینوزا، ۶۶ ایزوله (۳۷/۷ درصد) فنوتیپ ESBL مثبت بودند و ۱۰۹ ایزوله (۶۲/۳ درصد) فنوتیپ منفی گزارش شدند (شکل ۲).



شکل ۲) تست فنوتیپی تأییدی به روش Combined disk method

همچنین آزمون مجذور کای بین وجود فنوتیپ ESBL و وضعیت بیمار ارتباط معنی داری نشان داد ($P < 0.001$), به گونه ای که بیشترین فراوانی فنوتیپ ESBL مثبت در بین بیماران بستری مشاهده شد (جدول ۱).

جدول ۱) توزیع فراوانی سویه های pseudomonas آئروژینوزا

تحت بررسی بر اساس فنوتیپ				
وضعیت بیمار				
فراوانی ESBL	بستری		سرپایی	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد
فنوتیپ ESBL مثبت	۲۰/۸	۱۶	۵۱	۵۰
فنوتیپ ESBL منفی	۷۹/۲	۶۱	۴۹	۴۸

گردیده است (۱۰-۱۲) که با نتیجه به دست آمده در این مطالعه هماهنگی دارد. بیشترین میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین در مطالعه دکتر میر صالحیان و همکاران در سال ۲۰۰۷ میلادی گزارش گردید که با مطالعه ما همخوانی داشت (۱۳). در سایر مطالعات این میزان مقاومت بین ۸۰/۳-۲۷ درصد مشاهده شد (۹-۱۲).

در بررسی‌های انجام شده توسط سایر محققین بیشترین میزان مقاومت به تیکارسیلین ۵۳ درصد و تیکارسیلین/تیکارسیلین کلانولانیک اسید ۲۲/۸ درصد بوده (۱۰ و ۱۱) که مورد اول با مطالعه ما مطابقت داشته ولی در مورد دوم اختلاف قابل توجهی مشاهده می‌شود که از نظر علت آن می‌توان به مصرف بی‌رویه این آنتی‌بیوتیک بدون توجه به الگوی مقاومتی در بیمارستان‌های ما اشاره نمود. همچنین در مطالعه استراتوا (Starveta.t) و همکاران در سال ۲۰۰۷ میلادی در بلغارستان (۱۱) در ارتباط با پلی‌یکسین B مقاومتی مشاهده نشد اما در این مطالعه میزان مقاومت ۵/۱ درصد بود.

در بررسی مطالعات انجام شده در سال‌های اخیر، میزان مقاومت به سفنازیدیم میزانی بین ۸۵-۱۳/۴ درصد داشته همچنین در مورد سفپیم ۸۸-۱۵/۵ درصد می‌باشد (۱۰-۱۳). این ارقام نشان‌دهنده افزایش صعودی در میزان مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد و در مطالعه ما نیز افزایش میزان مقاومت مشاهده می‌گردد، که علت این افزایش مقاومت تجویز گسترده این آنتی‌بیوتیک مخصوصاً در کلینیک‌ها که باعث افزایش فشار انتخابی بر روی نمونه‌های حساس بوده و سبب افزایش نمونه‌های مقاوم می‌شود (۱۴ و ۱۵).

در این مطالعه مقاومت به ایمپنم نسبت به مطالعات انجام شده در فرانسه و بلغارستان پایین‌تر (۸۱/۵ و ۴۲/۳ درصد) بوده (۱۱ و ۱۲) به این دلیل که ایمپنم در کشور

ما یک آنتی‌بیوتیک بیمارستانی بوده و به راحتی و بدون تجویز پزشک در دسترس مردم قرار نمی‌گیرد. آنچه که از بررسی مطالعات مختلف ذکر شده استنباط می‌شود، مؤید این موضوع است که میزان مقاومت در کشورهای در حال توسعه و کشورهای جهان سوم در مقایسه با کشورهای توسعه یافته به مراتب بیشتر می‌باشد، که این امر احتمالاً حاصل کنترل مصرف آنتی‌بیوتیک در کشورهای توسعه یافته می‌باشد.

از طرفی در مطالعه ما میزان مقاومت در سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران بستری بیشتر از بیماران سرپایی می‌باشد، که نکته قابل توجهی که در خصوص بالا بودن این مقاومت در ایزوله‌های پسودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران بستری در بخش می‌توان ارائه نمود این است که به احتمال زیاد این عفونت‌ها دارای منشأ محیطی هستند و به دنبال بستری شدن بیمار و افزایش ابتلا به این باکتری، آلودگی و سپس عفونت پیش می‌آید.

از طرفی با مقایسه نتایج حاصل از این تحقیق و نتایج مطالعات قبل، آمار به دست آمده نشان‌دهنده آن است که درصد سویه‌های ESBL مثبت رو به افزایش است و این افزایش می‌تواند در نتیجه مصرف بیش از حد و طولانی مدت سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف در درمان بیماران و کسب مقاومت در سویه‌های باکتریایی باشد. در این مطالعه، سویه‌های مولد بتالاکتامازها با استفاده از روش فوتیپی بررسی شده‌اند، اما از آنجا که روش‌های فوتیپی نمی‌توانند تایپ و ساب تایپ‌های یک ESBL را نشان دهند، لذا انجام تکنیک‌های مولکولی از قبیل PCR جهت تشخیص انواع ESBL ضروری به نظر می‌رسد.

در نتیجه با توجه به میزان بالای مقاومت آنتی‌بیوتیکی مشاهده شده در این مطالعه و سایر بررسی‌ها و خطرناک بودن پسودوموناس آئروژینوزا در محیط بیمارستانی بنابراین نیاز است پیگیری‌های مکرری از

سویه‌ها در آزمایشگاه‌ها به صورت روتین استفاده گردد.

تشکر و قدردانی:

این پژوهش حاصل بخشی از پایان‌نامه دانشجویی سرکار خانم مانا شجاع پور (به شماره ۵۷۹) می‌باشد. لذا بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد به دلیل پشتیبانی مالی و کلیه همکاری‌ها که ما را در انجام این تحقیق یاری رساندند تشکر و قدردانی می‌نماییم.

الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی پseudomonas آئروژینوزا به عمل آید تا بتوان دستورالعمل درمانی مناسب‌تری را برای بیماران تهیه نمود.

در مجموع با توجه به نتایج الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی مشاهده شده در این مطالعه، پلی میکسین B بیشترین فعالیت ضد پseudomonas را در میان عوامل ضد میکروبی به کار رفته نشان داد. همچنین به دلیل شیوع بالای سویه‌های تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف می‌بایست از روش‌های تشخیصی سریع در تعیین این

References:

1. Yan JJ, Tsai SH, Chuang CL, et al. OXA-type beta-lactamases among extended-spectrum cephalosporin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a university hospital in southern Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* 2006; 39: 130-4.
2. S Shenoy, S Baliga, DR Saldanha, et al. Antibiotic sensitivity patterns of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from various clinical specimens. *Indian J Med Sci* 2002; 56: 427-30.
3. Pirnay J, De Vos D, Cochez C, et al. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in a burn unit: Persistence of a multidrug-resistant clone and a silver sulfadiazine-resistant clone. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1192-202.
4. Chanawong A, M'zali FH, Heritage J, et al. SHV-12, SHV-5, SHV-2a and VEB-1 extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria isolated in a university hospital in Thailand. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48: 839-52.
5. Prinsloo A, van Straten AMS, Weldhagen GF. Antibiotic synergy profiles of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a nosocomial environment. *South Afr J Epidemiol Infect* 2008; 23: 7-9.
6. Bonfiglio G, Carciotto V, Russo G, et al. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: an Italian survey. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41: 307-10.
7. Geha DJ, Uhl JR, Gustaferrero CA, et al. Multiplex PCR for Identification of Methicillin-Resistant *Staphylococci* in the Clinical Laboratory. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1768-72.
8. Knothe H, Shah P, Krcmery V, et al. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *klebsiella pneumoniae* and *serratia marcescens*. *Infection* 1983; 11: 315-7.
9. Vahdat K, Rezaie R, Gharibi O. Bacteriology of hospital-acquired infection and antibiotic resistance in a hospital university of Bushehr Port "Fateme Zahra (s)" in 2002-2003. *Iran South Med J* 2005; 7: 135-40.
10. Lee S, Park YJ, Kim M, et al. Prevalence of Ambler class A and D β -lactamases among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Korea. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 122-7.
11. Strateva T, Ouzounova-Raykova V, Markova B, et al. Problematic clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from the university hospitals in Sofia, Bulgaria: current status of antimicrobial resistance and prevailing resistance mechanisms. *J Med Microbiol* 2007; 56: 956-63.
12. Cavallo JD, Fabre R, Leblanc F, et al. Antibiotic susceptibility and mechanism of β -lactam resistance in 1310 strain of *Pseudomonas aeruginosa*: a French multicentre study (1996). *J Antimicrob Chemother* 2000; 46: 133-6.
13. Mirsalehian A, Feizabadi M, Akbari Nakhjavani F, et al. Prevalence of extended spectrum beta lactamases among strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients (Persian). *Tehran Uni Med J* 2008; 66: 333-7.
14. Carmeli Y, Troillet N, Eliopoulos GM et al. Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1379-82.
15. Srikumar R, Kon T, Gotoh N et al. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug Efflux Pumps MexA-MexB-OprM and MexC-MexD-OprJ in a multidrug-sensitive *Escherichia coli* strain. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 65-71.