



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 ارگانسیم‌های 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، تیکارسیلین، تیکارسیلین/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 ارگانسیم‌هایی 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 میکروبی و ایمنی‌شناسی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد

E-mail: bzamanzad@yahoo.com

مقدمه

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 به منظور تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و بررسی وجود بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در سویه‌های pseudomonas آئروژینوزا جدا شده از نمونه‌های کلینیکی بیمارستان‌های هاجر و کاشانی شهرکرد انجام شد.

مواد و روش کار

نمونه‌ها شامل ۱۷۵ مورد ایزوله pseudomonas آئروژینوزا غیرتکراری و متناوب بودند که طی یک دوره ۷ ماه از نمونه‌های بالینی (زخم، ادرار، خلط و خون) بیمارستان‌های آموزشی شهرکرد جدا شدند. نمونه‌ها بر اساس تست اکسیداز مثبت، تولید پیگمان در محیط مولر هیتون آگار، تست (Oxidation Fermentation) OF Triple بی‌هوازی منفی، وضعیت غیرتخمیری در محیط Triple TSI (Sugar Iron Agar) تعیین هویت شدند. ایزوله‌های pseudomonas آئروژینوزا جهت آزمایشات بعدی در محیط نگهدارنده (محیط کشت مایع حاوی گلیسرول) به صورت 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 به وسیله سوآپ استریل به محیط مولر هیتون آگار تلقیح گردید. سپس دیسک‌های

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

مقاومت آنتی‌بیوتیکی در pseudomonas آئروژینوزا به طریق 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).

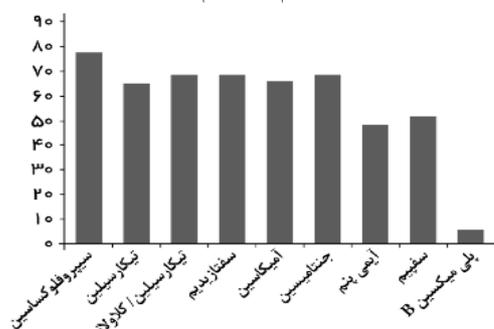
با توجه به اینکه شیوع مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در بیمارستان‌ها فراوان می‌باشد. از طرفی pseudomonas آئروژینوزا از مهم‌ترین عوامل ایجادکننده عفونت‌های بیمارستانی است. همچنین با توجه به اینکه تحقیقاتی که در مورد این پدیده پیچیده در یک مقطع زمانی در منطقه‌ای انجام می‌شود به زمان‌ها و مکان‌های دیگر قابل تعمیم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

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 پلی میکسین 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، سبیروفلوکساسین، تیکارسلین، تیکارسلین / کلولانیک اسید، ایمپنم، سفیم، سفتازیدیم، پلی میکسین 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* جدا شده از نمونه‌های بالینی از روش (Combination Disk Method) دیسک سفتازیدیم + دیسک ترکیبی سفتازیدیم کلولانیک 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-کلولانیک 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 آنتی‌بیوتیک‌ها در جوامع انسانی شناخته شده است و به صورت‌های تکی یا چند دارویی دیده می‌شود (۸). pseudomonas آئروژینوزا مقاومت زیادی به اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها دارد. مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این ارگانیسم با سرعت زیادی در حال افزایش است.

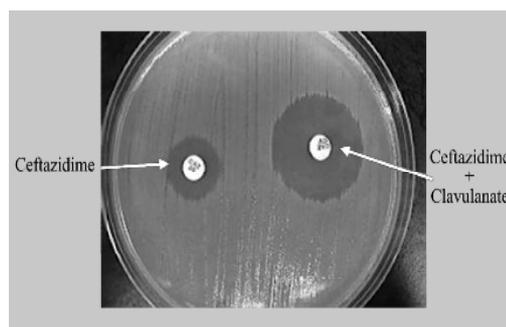
نتایج حاصل از مطالعه ما نیز نشان داد که درصد بالایی از سویه‌های ایزوله شده در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه مقاومت دارند، به‌طوریکه در این مطالعه میزان مقاومت pseudomonas آئروژینوزا به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، آمیکاسین، سیپروفلوکساسین، سفنازیدیم، تیکارسیلین، تیکارسیلین / کلولانیک اسید، ایمینم، سفپیم، پلی‌میکسین 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 می‌باشد.

در مورد مقاومت دارویی pseudomonas آئروژینوزاهای جدا شده از نمونه‌های 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 سال‌های اخیر انجام گرفته و مقایسه آنها با نتایج به‌دست آمده در این مطالعه می‌پردازیم.

در مطالعه انجام شده توسط دکتر وحدت و همکاران در طی سال ۲۰۰۳ میلادی میزان مقاومت به جنتامایسین ۵۶ درصد بوده که با نتیجه به‌دست آمده در مطالعه ما مطابقت داشت (۹). مطالعات گذشته‌نگر نیز در مورد مقاومت به این آنتی‌بیوتیک روند رو به افزایشی را نشان می‌دهند (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 به‌دست آمده میزان مقاومت در سویه‌های pseudomonas آئروژینوزا جدا شده از بیماران بستری بیشتر از بیماران سرپایی می‌باشد.

در تست فنوتیپی تأییدی به روش (combination disk method) کلیه ایزوله‌های مقاوم به سفنازیدیم به‌منظور 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 معنی‌داری نشان داد ($P < 0.001$), به‌گونه‌ای که بیشترین فراوانی فنوتیپ ESBL مثبت در بین بیماران بستری مشاهده شد (جدول ۱).

جدول ۱) توزیع فراوانی سویه‌های pseudomonas آئروژینوزا

تحت بررسی بر اساس فنوتیپ

فراوانی ESBL	وضعیت بیمار	
	بستری	سرپایی
	تعداد	درصد
فنوتیپ ESBL مثبت	۲۰/۸	۵۱
فنوتیپ ESBL منفی	۷۹/۲	۴۹

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 نشان دهنده 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

گردیده است (۱۲-۱۰) که با نتیجه به دست آمده در این مطالعه هماهنگی دارد. بیشترین میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین در مطالعه دکتر میرصالحیان 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

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 ضدپseudomonاسی را در میان عوامل ضد میکروبی به کار رفته نشان داد. همچنین به دلیل شیوع بالای سویه‌های تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف 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 marcescense*. *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 "Fatemeh 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.