مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره هشتم، شماره بیست و نهم - زمستان ۱۳۹۶

Research Article
مقاله تحقیقی

جداسازی *سودوموناس آئروژینوزای* مقاوم به آنتی‌بیوتیک دارای ژن ***bla_vim*** از محیط-های بیمارستانی

الهام سیاسی* ، **رباب رفیعی طباطبایی، فاطمه مصلحی مهر**

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی ، واحد تهران شمال ، تهران ، ایران.

چکیده:

سابقه و هدف: مصرف گسترده و بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها، دزانفکتانت‌ها وآنتی‌سپتیک‌ها در مراکز درمانی باعث پیدایش مقاومت در *سودوموناس آئروژنوزا* که یکی از مهم‌ترین عوامل عفونت در بیمارستان می‌باشد، شده است. هدف از این مطالعه بررسی حضور ژن *bla_vim* در *سودوموناس آئروژنوزای* مقاوم به بتالاکتام‌ها از محیط بیمارستان بود.

مواد و روش‌ها : ۱۲۰ سویه *سودوموناس آئروژنوزا* از محیط های بیمارستان جمع آوری شد. حساسیت این سویه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام به روش دیسک گذاری سنجیده شد. حضور ژن *bla_vim* با واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز بررسی شد.

یافته‌ها: در میان ۱۲۰ نمونه جداشده از محیط بیمارستان ۵۰ نمونه *سودوموناس آئروژینوزا* بود. در بین باکتری‌های مورد آزمایش ۳۵ نمونه به آنتی‌بیوتیک‌های خانواده بتالاکتام‌ها مقاوم بودند که از میان آن‌ها ۲۱ نمونه (۴۲٪) حاوی ژن *bla_vim* بودند.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این بررسی، حضور ژن *bla_ vim* را در *سودوموناس آئروژنوزا* نشان داد. با مقایسه سایر یافته در سراسر جهان، افزایش روز افزون مقاومت ژنتیکی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها به‌خصوص بتالاکتام‌ها مشخص می‌نماید. این نتایج برای کاربرد سیاست‌های صحیح استفاده از مواد ضد میکروبی حائز اهمیت است.

واژه‌های کلیدی: *سودوموناس آئروژینوزا*، مقاومت به آنتی‌بیوتیک، ژن *bla_ vim* ، بتالاکتام‌ها.

مقدمه

مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در سویه‌های مختلف یک مشکل سلامتی عمومی در جهان محسوب می‌شود که افزایش روز افزون آن در سطح جهان مطرح است. گزارش‌های مربوط به این مسئله از روی اصول بر پایه شناسایی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری‌های ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی بوده است. اما در سال‌های اخیر با شناسایی سویه‌های به چندین دارو (multi-drug resistant) به‌صورت گسترده در کشورهای مختلف، راه‌های پخش شدن و گسترش ژن‌های مربوط به مقاومت از اهمیت ویژه‌ای برخوردار شده و پتانسیل این خطر برای سلامت عمومی به‌خوبی مشخص شده است (۳، ۳۷،۲۴). از جمله مکان‌های پخش و گسترش باکتری‌های مقاوم می‌توان به مکان‌های عمومی هم‌چون مدارس، مراکز خرید، ادارات و سرویس‌های حمل و نقل و محیط‌های بیمارستانی اشاره کرد (۲۶،۱۹).

در مجموع عفونت‌های بیمارستانی به‌عنوان عفونت کسب شده در بیمارستان یا عفونت‌های مرتبط با بیمارستان مطرح می‌شود که پس از پذیرش بیمار در بیمارستان ۴۸ تا ۷۲ ساعت یا طی دوره‌ای مشخص ۱۰ تا ۳۰ روز پس از ترخیص رخ می‌دهد و شامل عفونت‌هایی می‌باشد که در هنگام پذیرش بیمار در بیمارستان وجود ندارد بلکه در طول اقامت بیمار در بیمارستان به‌وجود می‌آیند. عفونت بیمارستانی از ۵/۲ تا ۱۰ درصد متغیر بوده و طی ۲۰ سال تا ۳۶ درصد افزایش یافته است. به‌گفته سازمان بهداشت جهانی، ۵ تا ۱۰ درصد بیماران بستری در بیمارستان‌های کشورهای توسعه یافته، به یک عفونت بیمارستانی مبتلا شده که این رقم در کشورهای در حال توسعه به ۲۵ درصد می‌رسد. طبق بررسی‌های انجام شده، عفونت ادراری شایع‌ترین و پنومونی کشنده‌ترین عفونت‌های بیمارستانی محسوب می‌شود (۲۸).

از باکتری‌های بیماری‌زای رایج عامل ایجاد انواع عفونت‌ها می‌توان به *سودوموناس ائروژینوزا* اشاره نمود که حضورش در مکان‌های عمومی و بیمارستانی نیز بسیار گزارش شده است. این باکتری یک باسیل گرم منفی هوازی است که در بسیاری محیط‌های اکولوژیکی (nich) می‌تواند رشد کند اما محیط‌های مرطوب را ترجیح می‌دهد. در محیط‌های آبی با

نویسنده مسئول : گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی ، واحد تهران شمال ، تهران ، ایران
ایمیل : emi_biotech2006@yahoo.ca

تاریخ دریافت : ۱۳۹۵/۳/۲۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۸/۱۰

مواد مغذی کم یا الیگوترفیک و محیط‌های مغذی مانند فاضلاب و بدن انسان یافت می‌شود و یک پاتوژن شایع مجاری ادراری و دستگاه تناسلی در بیمارستان است. در همه دپارتمان‌های بیمارستان می‌تواند وجود داشته باشد، به‌خصوص در عفونت‌های بیمارستانی در بخش مراقبت‌های ویژه **intensive care unit (ICU)** وجود دارد که در آنجا حدود ۱۵٪ از عفونت‌های مربوطه را تشکیل می‌دهد (۳۳،۲).

در سال‌های اخیر ارتباط سویه‌های مقاوم به چندین دارو از *سودوموناس آئروژنوزا* با ایجاد عفونت‌های بیمارستانی بسیار گزارش شده است (۳۷،۲۴،۲). مقاومت *سودوموناس آئروژنوزا* به بسیاری از انواع آنتی‌بیوتیک و وجود مکانیسم‌های متنوع برای کسب مقاومت به کمابیش تمام آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر در حین درمان، درمان عفونت‌های مربوط به این پاتوژن را بسیار دشوار نموده است و سبب این نظر گردیده است که *سودوموناس آئروژنوزا*های مقاوم به چندین دارو به طور عمومی در بیمارستان به‌علت استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها به‌وجود آمده‌اند (۱۷، ۵ ،۲).

تحقیق‌های انجام شده در ایران و سایر نقاط جهان نشان داده است که *سودوموناس ائروژینوزا* یکی از پاتوژن‌های فرصت‌طلب است و مشکلات جدی در بیماران بستری شده در بخش مراقبت‌های ویژه و بخش سوختگی بیمارستان‌ها و بیماران دارای نقص سیستم ایمنی و عفونت خونی و بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس و سرطان‌ها ایجاد می‌نماید (۳۷،۳۴،۲۴،۶،۵).

در سال‌های اخیر مقاومت دارویی در بسیاری از سویه‌های *سودوموناس ائروژینوزا* گزارش شده است، به‌طوری‌که این باکتری نسبت به همه داروهای استاندارد برای درمان این باکتری نظیر کارباپنم و آمینوگلیکوزیدها مقاوم شده است و فقط به کلیستین حساس باقی مانده است (۳۷،۲۱،۱۷). کارباپنم‌ها از جمله ایمی پنم و مروپنم از مهم‌ترین آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر در درمان عفونت‌های سویه‌های چند مقاومتی *سودوموناس ائروژینوزا* هستند. مطالعه‌های دو سال اخیر در جمعیت *سودوموناس ائروژینوزا*، پیدایش مقاومت رو به افزایش به کارباپنم ها را گزارش نموده‌اند و بیان داشتند که باکتری این مقاومت را با مکانیسم‌های مختلفی هم‌چون تولید زیاد آنزیم بتالاکتاماز کروموزومی، بیان بالای سیستم افلاکس، تغییر یا حذف پروتئین غشای خارجی نظیر پورین‌ها و تولید آنزیم کارباپنماز کسب کرده است (۳۷،۱۷). اما موضوع جدید ژن‌های متحرک متالوبتالاکتامازها هستند که با عناصر متحرک ژنومی منتقل می‌شوند و روی اینتگرون کلاس I قرار دارند و ژن‌هایی را کد می‌کنند که مقاومت به متالوبتالاکتامازها و آمینوگلیکوزیدها و سایر آنتی‌بیوتیک‌ها را در بر دارند که سبب مقاومت وسیع به داروها می‌شوند (۳۷،۵،۲،۱).

چندین مطالعه در سال ۲۰۱۴ نشان داده است که مکانیسم مقاومت این باکتری به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام با تولید آنزیم بتالاکتاماز می‌باشد. دو گروه اصلی بتالاکتاماز به نام‌های سرین بتالاکتامازها و متالوبتالاکتامازها وجود دارند. متالوبتالاکتامازها گروه مهمی هستند که علاوه بر پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌ها و کارباپنم‌ها را هیدرولیز می‌نمایند ولی هنوز توانایی هیدرولیز آزترونام را ندارند (۱۷ ،۷ ، ۲ ،۱). این آنزیم‌ها برای فعالیت به کوفاکتور روی نیاز دارند و توسط موادی هم‌چون اتیلن‌دی‌آمین‌ترا استیک‌اسید، دی‌پیکولینیک‌اسید و ترکیب‌های تیول مهار می‌شوند ولی با مهارکننده‌های بتالاکتامازی معمول هم‌چون سولباکتام، تازوباکتام و کلاوونیک‌اسید مهار نمی‌شوند (۳۴،۲۹،۵،۱).

چندین مطالعه در ایران و نقاط مختلف دنیا بیان داشته است که آنزیم‌های بتالاکتاماز با تقسیم‌بندی آمبلر (Ambler) به چهار گروه A ، B ، C ، D تقسیم می شوند و متالوبتالاکتامازها در گروه B قرار می گیرند و دارای سه زیر کلاس BI , BII , BIII هستند. زیر کلاس BI بر اساس ساختار مولکولی به چهار رده شامل SPM ، GIM ، VIM ، IMPتقسیم می‌شوند که از بارزترین آن‌ها VIM می‌باشد که روی اینتگرون کلاس I قرار دارند و با عناصر متحرک ژنومی کد می‌شوند که منجر به مقاومت چندگانه می‌گردند و علاوه بر کارباپنم‌ها به آمینوگلیکوزیدها، فلوروکینولون‌ها و سایر کلاس های آنتی‌بیوتیکی نیز مقاوم هستند (۳۷،۱۷،۲،۱). این تحقیقات نشان داده‌اند که ژن‌های کد کننده آنزیم‌های متالوبتالاکتامازی پلاسمیدی هستند و به‌راحتی می‌توانند بین باکتری‌ها منتشر شوند. این ژن‌ها علاوه بر *سودوموناس ائروژینوزا* در باکتری‌هایی نظیر *E.coli*، *کلبسیلا پنومونیه* و *آسینتوباکتر بومانی* مشاهده شده است و با افزایش توانایی انتقال بین اعضای خانواده انتروباکتریاسه سبب توسعه مقاومت دارویی در باکتری‌های گرم منفی شده‌اند (۳۲،۲۲،۷،۶).

بنابراین از مجموع تحقیقات صورت گرفته در این خصوص چنین برآورد می شود که ارتباط عفونت های بیمارستانی با *سودوموناس ائروژینوزای* دارای متالوبتالاکتامازها (مقاومت پلاسمیدی) معزل چالش برانگیز در سیستم های کلینیکی محسوب می شود و منجر به ضایعات های شدید و بدون درمان موثر با این عفونت ها می گردد (۳۴و۲۸و۲۴و۶).

افزایش ظهور سویه‌های *سودوموناس ائروژینوزای* مقاوم به بتالاکتام‌ها در سراسر جهان گزارش شده است و در این زمینه ارتباط حضور ژن *vim* با *سودوموناس* ائروژینوزاهای مقاوم به بتالاکتامازها مورد توجه است. به‌خصوص توانایی انتقال افقی

ژن *vim* در بین باکتری‌های مقاوم به بتالاکتام‌ها (به‌ویژه باکتری‌های گرم منفی) سبب افزایش فراوانی سویه‌های مختلف مقاوم و ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی شده است. از این رو هدف از این تحقیق بررسی حضور ژن *bla_vim* در *سودوموناس آئروژنوزا*های موجود در محیط‌های بیمارستانی در جامعه و آن‌هم در شهرهای پر جمعیت هم‌چون تهران بوده است تا راه‌گشایی برای کاربرد سیستم‌های بهداشتی مناسب در این زمینه باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه- برای این مطالعه که علمی- پژوهشی می‌باشد، ۱۲۰ نمونه غیر بالینی به‌وسیله سوآپ استریل مرطوب، از محیط چهار بیمارستان در شرق تهران، جمع‌آوری شد و به آزمایشگاه منتقل شد.

مشاهده خصوصیت‌های مورفولوژیک- نمونه‌های جمع‌آوری شده در محیط BHI آگار کشت داده شد و به‌مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه نگه‌داری شد. پس از ۲۴ ساعت کلنی‌ها بر روی محیط ظاهر شد. ابتدا ظاهر کلنی‌ها و بوی شبیه انگور در روی محیط آگاردار مورد بررسی قرار گرفت. علاوه‌بر بررسی ظاهر کلنی و بوی آن، همولیز در آگار خون‌دار و هم‌چنین موکوئیدی بودن کلنی‌ها و نیز پیگمان‌های زرد- سبز یا سبز- آبی یا آبی بررسی گردید.

واکنش رنگ‌آمیزی افتراقی گرم- رنگ‌آمیزی گرم روی کشت‌های ۲۴-۱۸ ساعته انجام شد. باکتری‌های گرم مثبت در زیر میکروسکوپ به رنگ بنفش و باکتری‌های گرم منفی به رنگ صورتی دیده می‌شوند. سپس از باکتری‌های گرم منفی در چند سری کشت چهار مرحله‌ای روی محیط‌های اختصاصی خالص‌سازی انجام شد.

شناسایی ایزوله‌ها با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی- باکتری‌ها برای شناسایی بر روی محیط‌های بلاد آگار، مک‌کانکی آگار، TSI، SIM، سیمون سیترات، اوره آز، MR/VP و OF کشت داده شدند و پس از ۲۴ ساعت نگه داری در دمای ۳۷ درجه مورد بررسی قرار گرفتند.

تست اکسیداز و کاتالاز- به‌منظور انجام تست کاتالاز از آب اکسیژنه استفاده شد. برای انجام تست اکسیداز از کاغذ صافی و یک قطره محلول اکسیداز استفاده شد.

رشد در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد- برای سنجش توانایی رشد در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد، نمونه‌ها در محیط نوترینت براث کشت داده شده و سپس در بن ماری ۴۲ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از یک شب انکوباسیون ۴۲ درجه سانتی‌گراد، کدورت محیط کشت بررسی شد. (زیرا رشد *سودوموناس آئروژینوزا* در دمای $42\ C^{\circ}$ سبب تمایز این ارگانیسم از بقیهٔ گونه‌های سودوموناس می گردد).

بررسی رشد در محیط ستریمید آگار- از سیتریمید آگار نیز برای جداسازی انتخابی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* و افزایش تولید پیگمان استفاده می‌گردد (به‌علت حضور ترکیب سیتریمید در این محیط کشت) .

-تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی به‌روش انتشار از دیسک Diffusion Disk Test

برای بررسی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی روش تست انتشار از دیسک مطابق استاندارد با پروتکل استاندارد CLSI ۲۰۱۵ (Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines) و با استفاده از محیط کشت مولر هینتون آگار به‌عنوان محیط رشد باکتری‌ها و دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی انجام شد. به این ترتیب که ابتدا سوسپانسیونی از باکتری مورد نظر در آب مقطر تهیه شد که کدورت آن با کدورت لوله شماره ۰/۵ مک‌فارلند برابر بود. سپس با سوآپ استریل در کنار شعله از سوسپانسیون باکتری برداشت کرده و در سطح پلیت حاوی کشت مناسب برای آنتی‌بیوگرام که مولر هینتون آگار است کشت متراکم در سه جهت عمودی، افقی و مورب (تمام سطوح) انجام داده شد. سپس سوآپ دور پلیت کشیده شد و بعد سوآپ را سوزانده و در محلول ساولن انداخته شد. مرحله بعد قرار دادن دیسک‌های آنتی‌بیوتیک روی سطح محیط مولر هینتون آگار است که در فواصل معینی در کنار شعله و با پنس استریل گذاشته و با فشار روی محیط ثابت شد (آنتی‌بیوتیک‌های به‌کار رفته در این تست عبارت بودند از: سفوتاکسیم، سفتازیدیم، ایمی‌پنم، مروپنم، پیپیراسیلین تازوباکتام و سیپروفلوکساسین). سپس در پلیت را بسته و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری گردید. پس از این مدت پاسخ آزمون با اندازه‌گیری هاله عدم رشد باکتری که در اطراف دیسک‌ها به‌وجود می‌آید تعیین گردید. اندازه هاله با توجه به استاندارد CLSI تعیین شد و به‌صورت حساس، نیمه حساس (متوسط) و مقاوم گزارش شد.

تشخیص مولکولی - پس از تشخیص با استفاده از تست-های بیوشیمیایی به‌منظور تأیید نهایی ایزوله مورد نظر را بر روی محیط نوترینت آگار کشت داده و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای $37^{\circ}C$ از کلنی‌های خالص آن برای استخراج DNA پلاسمیدی استفاده شد.

۱- استخراج پلاسمید- به‌منظور بررسی حضور ژن *bla_vim* که بر روی پلاسمید باکتری قرار دارد، از کیت استخراج پلاسمید شرکت Metabion استفاده شد.

۲- واکنش زنجیره پلی‌مراز PCR- پس از استخراج DNA از پلاسمید برای انجام PCR، پرایمرهای اختصاصی مطابق با جدول ۱ به‌کار برده شد. هم‌چنین مقدار مواد به کار رفته در PCR و شرایط انجام واکنش به‌ترتیب در جدول۲ و ۳ نشان داده شده است.

جدول۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن*bla_vim*

ژن	توالی پرایمر ´3- ´5
bla_vim	Forward 5´-CGTGGGGTGCGAAAAACAC -3´ Reverse 5´- GAGCAAGTCTAGACCGCCCG-3´

جدول ۲- لیست مواد مورد استفاده برای واکنش PCR

مخلوط مواد PCR	مقدار مواد برای یک نمونه (µl)
• آب دوبار تقطیر و غیر یونیزه	۹/۵
• Master mix	۲/۵ 1
• پرایمر چپ	۱
• پرایمر راست	۱
• DNA نمونه	۱
حجم کلی بر حسب µl	۲۵

جدول ۳- شرایط انجام واکنش زنجیرهایی پلیمراز در ترموسایکلر برای ژن *bla_vim*

چرخه‌های دمایی PCR	دما (°c)	زمان	تعداد سیکل
مرحله واسرشتگی	۹۴	۴۵ ثانیه	-
مرحله اتصال	۵۲	۴۵ ثانیه	-
مرحله طویل شدن	۷۲	۶۰ ثانیه	۳۵
چرخه نهایی	۷۲	۵ دقیقه	-

۱- **الکتروفورز و مشاهده باند حاصل از PCR**- پس از اتمام واکنش‌های PCR، محصول واکنش، الکتروفورز گردید. برای انجام الکتروفورز از ژل آگارز ۱٪ استفاده شد. سپس با رنگ‌آمیزی به‌وسیله اتیدیوم برامید باندهای حاصل از محصول PCR برای ژن مورد نظر مشاهده شد.

نتایج

تشخیص ایزوله‌های بالینی باکتریایی- ۵۰ نمونه از ۱۲۰ نمونه که از سطوح داخل اماکن ، زمین و وسایل بیمارستان به کمک سواب مرطوب جمع‌آوری شد، بعد از کشت بر روی محیط‌های اختصاصی و انجام تست‌های افتراقی و رنگ‌آمیزی گرم و تست اکسیداز و کاتالاز، *سودوموناس ائروژینوزا* تشخیص داده شدند.

خصوصیت‌های مورفولوژیکی- شکل ظاهری باکتری باکشت نمونه‌ها بر روی محیط EMB وBHI و رشد در دمای ۳۷ °c مشخص شد سپس با رنگ‌آمیزی گرم همه ایزوله‌ها گرم منفی و میله‌ای شکل و کوکو باسیل مشاهده شدند.

نتایج آزمون کاتالاز و اکسیداز- *سودوموناس آئروژنوزا* در برخورد با اکسیداز رنگ بنفش تولید نمود و اکسیداز مثبت بود و در حضور H2O2 توسط آنزیم کاتالاز حباب اکسیژن تولید کرد و کاتالاز مثبت گزارش شد.

نتایج تست‌های بیوشیمیایی- جدول ۴ نشان دهنده نتایج کشت باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* در محیط‌های کشت افتراقی (TSI، SIM، MRVP، OF، سیمون سیترات، اوره، سیتریمید آگار) که برای شناسایی و جداسازی باکتری انجام گرفته است، می‌باشد.

جدول ۴-نتایج حاصل از تست‌های بیوشیمیایی برای شناسایی و جداسازی *سودوموناس آئروژینوزا*

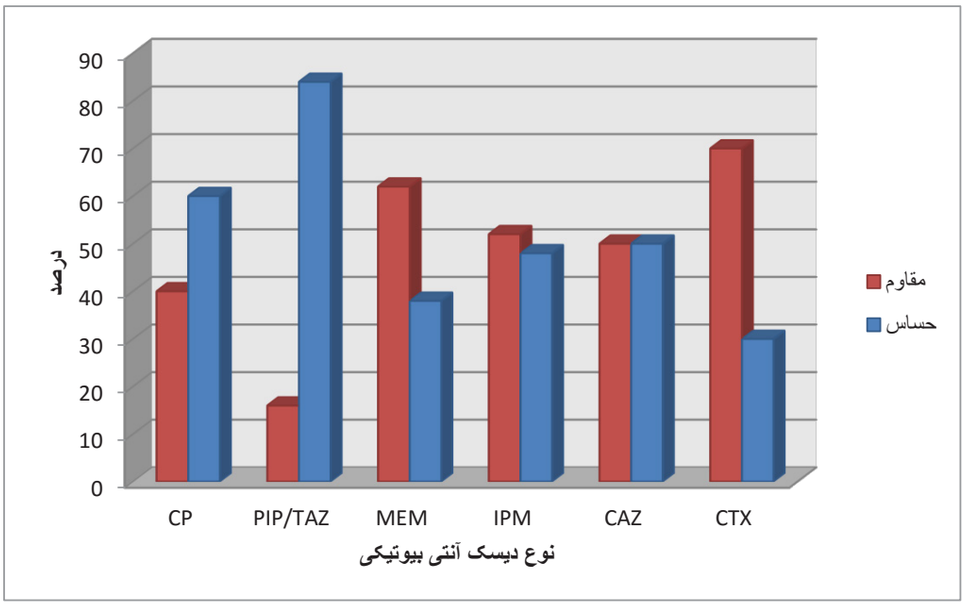
OF		VP	MR	سیمون سیترات	اوره	SIM	TSI	سیتریمید آگار	اکسیداز	کاتالاز	رنگ‌آمیزی گرم	های تست بیوشیمیایی
هوازی	بیهوازی											
+	-	-	-	+	+	+ - -	alk/alk	کلنی سبز	+	+	-	نتایج

نتایج حاصل از سنجش مقاومت به آنتی‌بیوتیک با روش دیسک گذاری

– در این مطالعه مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام در **۵۰** سویه *سودوموناس آئروژینوزا* با روش انتشار از دیسک سنجیده شد و ۳۵ نمونه مقاوم به‌دست آمد. در بین ۳۵ نمونه مقاوم بیش‌ترین مقاومت باکتری‌های *سودوموناس آئروژینوزا* نسبت به سفتوتاکسیم (به‌میزان ۷۰٪) و بیش‌ترین حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک پیپیراسیلین (به‌میزان ۸۴٪) بود. هم‌چنین بین مثبت بودن کشت باکتری و مقاومت آنتی‌بیوتیکی با تعداد نمونه‌ها از نظر آماری اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. نتایج تست آنتی-بیوگرام با آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی مورد استفاده در این تحقیق، در جدول ۵ و نمودار ۱ آورده شده است.

جدول ۵- مقاومت سویه های سودوموناس ائروژینوزا نسبت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام

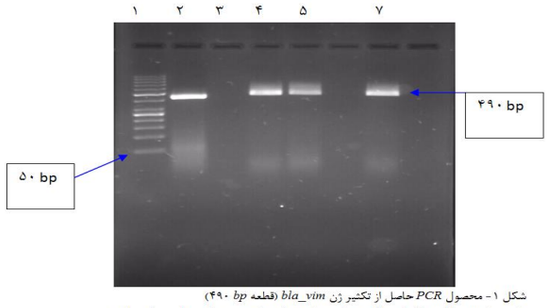
سودوموناس آئروژینوزا	سیپروفلوکساسین CP	پیپیراسیلین تازوباکتام PIP/TAZ	مروپنم MEM	ایمی پنم IPM	سفتازیدیم CAZ	سفوتاکسیم CTX
نمونه‌های مقاوم	۴۰٪ n=۲۰	۱۶٪ n=۸	۶۲٪ n=۳۱	۵۲٪ n=۲۶	۵۰٪ n=۲۵	۷۰٪ n=۳۵
نمونه‌های حساس	۶۰٪ n =۳۰	۸۴٪ n =۴۲	۳۸٪ n =۱۹	۴۸٪ n =۲۴	۵۰٪ n =۲۵	۳۰٪ n =۱۵



نمودار ۱- درصد مقاومت و حساسیت سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* به دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی بتالاکتامی
(از راست به چپ: سفوتاکسیم، سفتازیدیم، ایمی پنم، مروپنم، پیپیراسیلین تازوباکتام و سیپروفلوکساسین)

نتایج حاصل از PCR

– در مجموع از ۳۵ نمونه *سودوموناس آئروژینوزای* مقاوم به بتالاکتام‌ها، ۲۱ نمونه دارای ژن *bla_vim* بودند و فراوانی این ژن در نمونه‌ها ۴۲ ٪ بود. حضور ژن *bla_vim* در نمونه محصول PCR، پس از رنگ‌آمیزی روی ژل الکتروفورز در شکل ۱ نشان داده شده است. برای این منظور از مارکر مولکولی ۵۰ bp ، ویال بدون DNA به‌عنوان کنترل منفی و نمونه شارپ دارای باند ۴۹۰ bp به‌عنوان کنترل مثبت، استفاده شده است.



شکل ۱- محصول *PCR* حاصل از تکثیر ژن *bla_vim* (قطعه *bp* ۴۹۰)
خانه شماره۱- مارکر مولکولی *bp* ۵۰، خانه شماره۲- کنترل مثبت، خانه شماره ۳- کنترل منفی،
خانه‌های شماره ۴ و ۵ و ۷ نمونه *سودوموناس ائروژینوزای* مقاوم دارای ژن *bla_vim*.

بحث

سودوموناس آئروژینوزا پاتوژن فرصت‌طلب انسانی است. این باکتری به طور معمول بیمارانی که نقص در سیستم ایمنی خود دارند را مورد حمله قرار می دهد مثل افرادی که از

بیماری‌هایی مانند سیستیک فیبروزیس ریوی، سرطان یا ایدز رنج می‌برند (۱۴). این باکتری پاتوژن بسیار مهمی است زیرا اغلب به بیماران بستری در بیمارستان‌ها حمله کرده و باعث ایجاد بیماری‌های بسیار خطرناک تر در آن‌ها می‌شود. *سودوموناس آئروژینوزا* عامل بیش‌ترین عفونت با باکتری‌های گرم منفی است که ۴۰ تا ۶۰ درصد مرگ و میر را شامل می‌شود. در میزان بالایی از مرگ و میرهایی ناشی از سیستیک فیبروزیس ریوی دخالت دارد و در نهایت این باکتری همیشه جزو یکی از سه باکتری گرم منفی پاتوژن است که سبب بدترین بیماری‌های عفونی می‌شود (۱۴). این باکتری هم-چنین مقاومت ذاتی بالایی را به بسیاری از ترکیب‌های ضدمیکروبی و آنتی‌بیوتیک‌ها نشان می‌دهد و این مسئله باعث ایجاد مشکل در از بین بردن و حذف آن‌ها شده است (۴).

در این تحقیق ۱۲۰ نمونه از محیط‌های بیمارستانی جمع آوری شد و ابتدا بر روی محیط BHI آگار کشت داده شدند. سپس به‌وسیله تست‌های بیوشیمیایی از جمله کشت بر روی محیط‌های مک کانکی آگار، TSI ، SIM ، سیمون سیترات، سیتریمید آگار و تست‌های اکسیداز و کاتالاز شناسایی شدند. بعد از تأیید *سودوموناس آئروژینوزا* بودن این باکتری‌ها، نمونه‌های مورد نظر بر روی محیط سیتریمید آگار که محیط اختصاصی برای *سودوموناس آئروژینوزا* است به‌منظور مطالعه بیش‌تر کشت و نگهداری شدند. این محیط به‌دلیل داشتن سیتریمید که نوعی ترکیب ضد میکروبی است از رشد سایر باکتری‌ها جلوگیری کرده و تنها *سودوموناس آئروژینوزا* که قادر به تحمل آن است بر روی آن باقی می‌ماند.

در این مطالعه از ۱۲۰ نمونه جداشده از محیط بیمارستان ۵۰ نمونه *سودوموناس آئروژینوزا* بودند که از ۵۰ نمونه *سودوموناس آئروژینوزا* ۳۵ نمونه به انواع آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام استفاده شده در این تحقیق مقاوم بودند. این نمونه‌ها نسبت به سیپروفلوکساسین ۴۰٪، پیپیراسیلین- تازوباکتام ۱۶٪، ایمی پنم ۵۲٪، مروپنم۶۲٪، سفتازیدیم۵۰٪ و سفوتاکسیم ۸۴٪ مقاومت داشتند و از میان آن‌ها ۲۱ نمونه (۴۲٪) حاوی ژن *bla_vim* بودند.

کازاما و همکارانش در سال ۱۹۹۷ برای جداسازی سودوموناس آئروژنوزا از سایر باکتری‌های گرم منفی از محیط BHI آگار و BHI براث استفاده کردند. نوع محیط کشتی که آن‌ها برای جداسازی نمونه‌ها استفاده کردند با محیط کشتی که در این مطالعه برای سویه‌ها استفاده شد مطابقت داشت (۱۰). در سال ۲۰۱۰ یوسفی و همکارانش، باکتری‌های سودوموناس آئروژنوزا را از خون، زخم و ادرار جداسازی کردند و آن‌ها را توسط تست‌های بیوشیمیایی مانند رنگ‌آمیزی گرم، تست اکسیداز و کاتالاز و رشد در محیط ستریمید آگار شناسایی کردند. روش‌های بیوشیمیایی و محیط کشت اختصاصی که یوسفی و همکارانش در مطالعه خود بر روی سودوموناس آئروژنوزا برای شناسایی و ایزوله استفاده کرده بود با روش‌ها و محیط‌های کشت اختصاصی در این بررسی مطابقت داشت (۳۶).

زافر و همکاران، در سال ۲۰۱۵ به بررسی حضور ژن *bla_vim* در ۳۳ نمونه سودوموناس مقاوم به کارباپنم در مصر پرداختند که ۲۸ نمونه دارای این ژن بودند (۳۷). در مطالعه زافر آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده تا حدود زیادی با مطالعه حاضر مشابهت داشتند و هم‌چنین از نظر روش‌های سنجش مقاومت آنتی‌بیوتیکی و استفاده از محیط کشت مولر هینتون آگار با مطالعه حاضر مطابقت داشت و همگی طبق روش‌های استاندارد CLSI انجام شده بود.

آقامیری و همکارانش، در سال ۲۰۱۴ در ایران ۲۱۲ نمونه *سودوموناس آئروژینوزا* از بیماران بیمارستان‌های تهران جدا کردند که ۱۰۰ نمونه مقاوم به ایمی‌پنم بود و از این میان ۷۰ نمونه ژن *bla_vim* و ۲۰ نمونه *bla_imp* را داشتند (۱). مطالعه آقامیری، از نقطه نظر تست‌های بیوشیمیایی با مطالعه حاضر مطابقت دارد و در تمامی آن‌ها از روش‌های استاندارد استفاده شده است. مطالعه‌های آقامیری با مطالعه حاضر، از نظر تعداد نمونه‌های محیطی جمع‌آوری شده و هم‌چنین تعداد سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* خالص‌سازی شده تفاوت داشته و هم‌چنین مدت زمان انجام مطالعه نیز از جمله تفاوت‌ها می‌توان در نظر داشت. باید به این نکته توجه داشت که هر چه مدت زمان انجام مطالعه و تعداد نمونه‌های محیطی جمع‌آوری شده بیش‌تر باشد مطالعه از لحاظ آماری ارزش بیش‌تری خواهد داشت.

اخوان تفتی و همکاران در سال ۲۰۱۴، به بررسی ژن‌های *bla_vim*، *bla_imp* و *bla_ndm* در ۱۸۰ نمونه سودوموناس گرفته شده از بیماران سوختگی پوستی در شهر یزد پرداختند که از ۵۴ نمونه سودوموناس ائروژینوزای جدا شده ۷۴٪ به ایمی‌پنم مقاوم گزارش شدند و ۲۹/۵ ٪ ایزوله‌ها دارای ژن‌های متالوبتالاکتاماز بودند (۲). در مطالعه تفتی و همکارانش، ژن‌های مسئول مقاومت‌های دارویی چندگانه مانند *bla_vim*، *bla_imp* و *bla_ndm* بررسی شدند، که از جمله تفاوت‌های موجود با مطالعه حاضر بررسی ژن‌های بیش‌تری در مطالعه تفتی می‌باشد. هم‌چنین مطالعه تفتی و همکارانش، از نظر نوع نمونه (نمونه بالینی از بیماران بخش سوختگی بیمارستان) با مطالعه حاضر (نمونه غیر بالینی، نمونه‌گیری از محیط بیمارستان) مطابقت نداشت ولی از نظر تست‌های بیوشیمیایی با مطالعه حاضر مشابه بود و از روش‌های استاندارد استفاده شده بود.

گلشنی و همکاران در سال ۲۰۱۴ بیان داشتند کارباپنم‌ها از جمله ایمی‌پنم و مروپنم از مهم‌ترین آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان عفونت‌های ناشی از سویه‌های چند مقاومتی *سودوموناس ائروژینوزا* هستند. آنان ژن *vim* را از بارزترین ژن های متالوبتالاکتامازی یافتند و گزارش نمودند این ژن در سایر باکتری‌های گرم منفی علاوه بر *سودوموناس ائروژینوزا* انتقال می‌یابد و سبب افزایش مقاومت دارویی در این باکتری ها می‌باشد. در تحقیق‌های آنان حضور ژن *vim* را در ۱۸٪ از سویه‌های *سودوموناس ائروژینوزای* دارای مقاومت چندگانه و ایجاد کننده عفونت بیمارستانی گزارش شد و روند رو به افزایش ژن‌های متالوبتالاکتامازی را در نمونه‌های بالینی نشان داد (۷). روش کار در این مطالعه با مطالعه گلشنی مشابهت داشته است ولی از نظر نوع نمونه‌ها که در این مطالعه از محیط بیمارستانی بوده است با مطالعه گلشنی که از نمونه های بالینی بوده است تفاوت دارد.

مینی و همکاران در سال ۲۰۱۴ در تحقیقی عنوان داشتند متالوبتالاکتامازها گروه مهمی از آنزیم‌های بتالاکتامازی هستند که سبب مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی می‌شوند. آنان ژن‌های vim، IMP، NDM را گروه‌های اصلی تولید کننده متالوبتالاکتامازها گزارش نمودند. هم‌چنین بیان داشتند عناصر متحرک ژنتیکی علاوه بر ژن‌های مقاوم به کارباپنم‌ها، ژن‌های مقاوم به آمینوگلیکوزیدها و کینولون‌ها را انتقال می-دهند که منجر به ایجاد مقاومت چندگانه به آنتی‌بیوتیک‌ها شده و کاربرد این داروها را برای درمان عفونت‌ها دچار بحران می‌نمایند.

صدیقی و همکاران در سال ۲۰۱۴ *سودوموناس ائروژینوزا* مقاوم به بتالاکتام‌ها را در نقاط مختلف ایران بررسی نمودند و نشان دادند که حضور کاست ژنی *vim-1* در باکتری‌های مقاوم و انتقال افقی این ژن در بین باکتری‌های مقاوم به بتالاکتام‌ها سبب افزایش شیوع عفونت‌های بیمارستانی با سویه‌های مقاوم به دارو شده است (۲۴).

در سال ۲۰۱۳ دوستی و همکاران به جداسازی و بررسی فنوتیپی و مولکولی ژن‌های متالوبتالاکتامازی در *سودوموناس ائروژینوزا*های جدا شده از بیمارستان ولیعصر زنجان پرداختند. از ۷۰ نمونه بالینی *سودوموناس ائروژینوزا* ۴۴ نمونه دارای مقاومت به ایمی‌پنم بودند که در میان آن‌ها ۲۳ ایزوله (۵۲٪/۲) دارای ژن *vim* و ۱۰ ایزوله (۲۲٪/۳) دارای ژن *IMP* بودند. نتایج آنان نشان داد مقاومت آنتی‌بیوتیکی با تولید آنزیم متالوبتالاکتامازی روند رو به رشدی در این منطقه از ایران داشته است (۵). نتایج این مطالعه با نتایج به‌دست آمده از تحقیق‌های دوستی مشابهت داشته و درصد ایزوله‌های *سودوموناس ائروژینوزای* مقاوم به بتالاکتام‌ها و دارای ژن *vim* را ۴۲٪ نشان داده است.

مهینی و همکارانش، در سال ۲۰۱۳ بر روی ژن *bla_vim* *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از بیماران سوختگی کار کردند. نتایج حاصل از بررسی مقاومت به آنتی‌بیوتیک در این بررسی به قرار زیر بود: ۲۰٪ ایزوله‌ها مقاوم به پیپیراسیلین تازوباکتام، ۲۳٪ مقاومت به مروپنم، ۴۱٪ مقاومت به ایمی‌پنم، ۷۰٪ مقاومت به تیکارسیلین و ۸۱٪ مقاومت به سفتازیدیم داشتند. از این میان ۴۱ ایزوله که به آنتی‌بیوتیک ایمیپنم مقاومت فنوتیپی داشتند حاوی ژن *bla_vim* بودند (۱۵). مطالعه حاضر از لحاظ مقاومت فنوتیپی به قرار زیر بوده: ۴۰٪مقاوم به سیپروفلوکساسین، ۱۶٪ مقاوم به پیپیراسیلین تازوباکتام، ۵۲٪ مقاوم به ایمی‌پنم، ۶۲٪ مقاوم به مروپنم، ۵۰٪ مقاوم به سفتازیدیم و ۷۰٪ مقاوم به سفوتاکسیم بودند. از نظر فنوتیپی مطالعه حاضر با مطالعه مهینی و همکارانش مطابقت دارد ولی از لحاظ درصد حضور ژن *bla_vim* متفاوت بوده زیرا نمونه‌های مورد بررسی این مطالعه از محیط بوده و میزان شیوع ژن *bla_vim* نسبت به نمونه‌های بالینی کم‌تر بوده است (۱۵).

خاخار و همکاران، در سال ۲۰۱۲ به بررسی حضور ژن *bla_vim* در سودوموناس‌های کلینیکی جدا شده از بیمارستان‌های هند پرداختند که از میان ۱۳۵ نمونه جمع‌آوری شده ۲۶ نمونه مقاوم به کارباپنم و ۱۵ نمونه دارای ژن *bla_vim* بودند(۱۸). یافته‌های این تحقیق با این مطالعه تا حدی شباهت دارند.

سرهنگی و همکاران، در سال ۲۰۱۲ به بررسی ژن‌های متالوبتالاکتاماز در ۲۴۰ نمونه سودوموناس جمع‌آوری شده از ۴ بیمارستان شیراز پرداختند که ۲۳/۳٪ از آن‌ها دارای این ژن‌ها بودند (۲۳). این مطالعه نیز با بررسی حاضر، مطابقت دارد که نشان دهنده شیوع این ژن مقاومت در سال‌های اخیر در ایران است.

کلانتر و همکاران، در سال ۲۰۱۱ به بررسی حضور متالوبتالاکتاماز در سودوموناس‌های جمع‌آوری شده از سوختگی‌های پوستی پرداختند که از میان ۱۰۰ نمونه ۲۲٪ دارای این ژن بودند (۹). از جمله تفاوت‌های مطالعه حاضر در مقایسه با مطالعه کلانتر، میتوان به میزان مقاومت به آنتی-بیوتیک و درصد حضور ژن *bla_vim* در نمونه‌های جمع‌آوری شده از بیماران دارای سوختگی‌های پوستی و نمونه‌های محیطی بیمارستانی اشاره کرد، که این اختلاف در نمونه‌ها و نحوه نمونه‌گیری می‌تواند دلیلی بر این تفاوت باشد.

لیاکوپولوس و همکاران، در سال ۲۰۱۱ به بررسی حضور ژن *bla_vim* در ۵۶۸ نمونه سودوموناس عفونی در یونان

پرداختند که در این میان ۱۴٪ دارای این ژن بودند (۱۳). مطالعه لیاکاپولوس با مطالعه حاضر از نظر درصد حضور ژن *bla_vim* و هم‌چنین تعداد نمونه‌های مقاوم متفاوت می‌باشد، که اختلاف مناطق جغرافیایی و استفاده بی‌رویه از آنتی-بیوتیک‌ها را می‌توان دلیلی بر این تفاوت‌ها دانست.

واندر بیج و همکاران در سال ۲۰۱۱، به بررسی حضور ژن *bla_vim* در سودوموناس‌های جداسازی شده از بیماران عفونی در هلند پرداختند که از میان ۱۰۶ نمونه مقاوم به ایمی‌پنم ۳۵ نمونه حاوی این ژن بودند (۳۰). مقاومت *سودوموناس آئروژینوزا* در مطالعه حاضر در مقایسه با مطالعه واندر بیج متفاوت بود که این تفاوت در تعداد نمونه‌ها و فاصله زمانی اجرای این دو مطالعه می‌باشد.

از مقایسه نتایج این تحقیق با سایر مطالعه‌های انجام شده در ایران و سراسر دنیا مشخص گردیده است که پیدایش سویه-های *سودوموناس ائروژینوزای* مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها به ویزه با تولید متالوبتالاکتامازها در محیط بیمارستان و نمونه‌های کلینیکی در حال افزایش است و این سویه‌ها با مقاوم شدن ژنتیکی و انتقال ژن‌های کد کننده مقاومت به بتالاکتام‌ها بین سویه‌های پاتوژن به‌خصوص باکتری‌های گرم منفی همراه می-باشند که مشکل جدی در تهدید سیستم‌های بهداشتی برای کنترل و درمان عفونت با این باکتری و کاربرد آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌های بیمارستانی محسوب می‌گردد.

نتیجه‌گیری

متاسفانه استفاده نادرست و بیش از اندازه از آنتی‌بیوتیک‌ها موجب پیدایش سویه‌های مقاوم در بین باکتری‌ها از جمله *سودوموناس آئروژینوزا* شده است که عامل اصلی مرگ و میر در بیماران به‌خصوص بیمارانی با ضعف سیستم ایمنی شده است. این سویه‌ها با بیان ژن *bla_vim* قادرند میزان بیش‌تری از آنتی‌بیوتیک‌ها به‌خصوص بتالاکتام‌ها را تحمل کنند که باعث مزیت انتخاب آن‌ها نسبت به سایر سویه‌ها شده است. در مطالعه انجام شده ارتباط مؤثری بین وجود ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام و سودوموناس ائروژینوزا های مقاوم به این آنتی‌بیوتیک‌ها مشاهده شده است. این ارتباط بیان‌گر این مطلب است که استفاده بیش از حد آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند منجر به‌ظهور سویه‌های مقاوم به دارو گردد. بنابراین حضور ژن *bla_vim* در *سودوموناس آئروژینوزا* و توانایی آن در انتقال افقی این ژن می‌تواند سبب افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی در این باکتری و احتمال بروز مقاومت در سایر باکتری‌های گرم منفی (بین آنتروباکتریاسه ها) گردد.

سپاسگزاری

از کلیه مسئولین محترم در دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال به‌خصوص دانشکده علوم زیستی و مسئولین بیمارستان‌ها و مراکز درمانی و آزمایشگاهی شرق تهران که در انجام کارهای آزمایشگاهی و تهیه نمونه‌های این تحقیق کمال همکاری و مساعدت لازم را مبذول فرموده‌اند، سپاسگزاری فراوان می‌گردد.

منابع

1.Aghamiri S, Amirmozafari N, FallahMehrabadi J, Fouladtan B, Samadi Kafil H. Antibiotic Resistance Pattern and Evaluation of Metallo-Beta Lactamase Genes Including bla-IMP and bla-VIM Types in *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Patients in Tehran Hospitals. *ISRN Microbiology*, 2014; 2014:1-6.

2. Akhavan-Tafti F, Eslami G, Zandi H, Mousavi SM, Zarei M. Prevalence of blaVIM, blaIPM and blaNDM Metallo-Beta-Lactamases Enzymes in *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Burn Wounds in Shahid Sadoughi Burn Hospital , Yazd, Iran. *Journal of Isfahan Medical School*, 2014; 31(263):1955-64.

3. Baba T, Takeuchi F, Kuroda M, Yuzawa H, Aoki K, Oguchi A, Nagai Y, Iwama N, Asano K, Naimi T, Kuroda H, Cui L, Yamamoto K, Hiramatsu K. 2002,Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet*. 2002; 359(9320):1819-27.

4. Brian WJ M. Vol 1:Virology, Collier L, Albert Balows A, SussmanM. Topley and Wison's microbiology and microbial infections. 9th ed, New York, Oxford University Press, 2005, 245-1138.

5. Dosti M, Ramezani A, Faghihi M. Isolation and study on phenotype and molecular characters of metallo-β-lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Clinical Samples of Zanjan Valiasr hospital. *J Kurdestan J Res Med Sci,* 2013; 18:97-105.

6. Golshani Z, Ahadi AM, Sharifzadeh A. Study on frequency of VIM-1 metallo-β-lactamase gene in multidrug resistance *Pseudomonas aeruginosa* from hospital. *J Veterinary Exp Res*, 2012; 4(1):119.

7. Golshani Z, Ahadi AM, Sharifzadeh A. Occurrence of Ambler Class B Metallo- β -Lactamase Gene in Imipenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Clinical Samples. *Zahedan J Res Med Sci*, 2014; 16(2): 6-9.

8. Huang YT, Chang SC, Lauderdale TL, Yang AJ, Wang JT. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying metallo-beta-lactamase genes in Taiwan. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2007; 59(2):211-6.

9. kalantar E, Torabi V, Ssalimizand H, Soheili F, Beiranvand S, Soltan Dallal MM. First survey of Metallo-B-Lactamase producers in clinical *Pseudomonas* from a burn center in Kurdistan province. *Jundishapur J Nat Pharm Prod*, 2012; 7(1):23-6.

10. Kazama H, Hamashima H, Sasatsu M, Arai T. Distribution of the antiseptic-resistance genes qacE and qacEv1 in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 1998; 159 (2):173-8.

11. Kerr KG, Snelling AM. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *J Hosp Infect*, 2009; 73(4):338-44.

12. Laupland KB, Parkins MD, Church DL, Gregson DB, Louie TJ, Conly JM, Elsayed S, Pitout JD. Population-based epidemiological study of infections caused by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary Health Region: importance of metallobeta- lactamase (MBL)-producing strains. *J Infect Dis*, 2005; 192(9):1606-12.

13. Liakopoulos A, Mavroidi A, Katsifas EA, Theodosiou A, Karagouni AD, Miriagou V, Petinaki E. Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* from central Greece: molecular epidemiology and genetic analysis of class I integrons. *BMC Infectious Diseases*, 2013; 13(505):1-5.

14. Lyczak JB[1], Cannon CL, Pier GB. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infectione:lessonsn from a versatile opportunist. Microbes Infect, 2000; 2(9):1051-60.

15. Mahini F, Khosravi A. Isolation of Metallo-B-Lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* from patients with burn infections and identify *bla_vim* and *bla_imp* genes with PCR. *Iranian Journal of Microbiology*, 2008; 1(1):23-31.

16. Martinez-Martinez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid.. *Lancet*, 1998; 351(9105):797–799.

17. Meini MR, Llarrull LI, Vila AJ. Evolution of Metallo-β-lactamases: Trends Revealed by Natural Diversity and *in vitro* Evolution. *Antibiotics,* 2014; *3*:285-316.

18. Muller M. Pyocyanin iduces oxidative stress in human endothelial cells and modulates the glutathione redox cycle. *Free Radic Biol Med*, 2002; (11):1527-33.

19. Nobile C, Costantino R, Bianco A, Pileggi C, Pavia M. Prevalence and pattern of antibiotic resistance of *Campylobacter spp*. in poultry meat in Southern Italy. *Food Control*, 2013; 32:715-8.

20. Oh EJ, Lee S, Park YJ, Park JJ, Park K, Kim SI, Kang MW, Kim BK. Prevalence of metallo beta lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannnii* in a Korean university hospital and comparison of screening methods for detecting metallo beta lactamase. J *Microbiol Methods*, 2003; 54(3):411-8.

21. Palzkill T. Metallo-β-lactamase structure and function. *Ann N Y Acad Sci*. 2013; 1277:91–104.

22. Samuelsen O, Buarø L, Giske CG, Simonsen GS, Aasnaes B, Sundsfjord A. Evaluation of phenotypic tests for the detection of metallo-beta-bactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in a low prevalence country. *J Antimicrob Chemother,* 2005; 61(4):827-30.

23. Sarhangi M, Motamedifar M, Sarvari J. Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* Producing blaIMP1, blaVIM2, blaSIM1, blaSPM1 in Shiraz, Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 2013; 6(7):e6920.

24. Sedighi M, Salehi-Abargouei A, Oryan G, Faghri J. Epidemiology of VIM-1-imipenem resistant Pseudomonas aeruginosa in Iran: A systematic review and meta-analysis. *J Res Med Sci*, 2014; 19:899-903.

25. Slekovec C, Plantin J, Cholley P, Thouverez M, Talon D, Bertrand X, Hocque D. Tracking down antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a wastewater network. *PLoS One*, 2012; 7(12):e49300.

26. Sobhy N, Aly F, Abd El Kader O, Ghazal A, Elbaradei A. Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus from skin and soft tissue infections (in a sample of Egyptian population): Analysis of mec gene and staphylococcal cassette chromosome. *Braz J Infect Dis,* 2012; 16(5):426-31.

27. Strateva T, Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol*, 2009; 58(9):1133-48.
28. Taheri1 N, Abtahi H, Amozande-Nobaveh A, Zarinfar N, Ghaznavi-Rad E. The Antibiotic Resistant Determinant of Pathogenic Bacteria Isolated from Medical Equipment and Hospital Environment in Valiasr Hospital. *J Mazand Univ Med Sci,* 2014; 24(114): 60-73 (Persian).
29. Tan J, Pitout JD, Guttman DS. New and sensitive assay for determining *Pseudomonas aeruginosa* metallo-beta-lactamase resistance to imipenem. *J Clin Microbiol*, 2008; 46(5):1870-2.
30. Van der Bij AK, Van Mansfeld R, Peirano G, Goessens WH, Severin JA, Pitout JD, Willems R, Van Westreenen M. First outbreak of VIM-2 metallo-β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in The Netherlands: microbiology, epidemiology and clinical outcomes. *Int J Antimicrob Agents,* 2011; 37(6):513-8.
31. Vettoretti L, Floret N, Hocquet D, Dehecq B, Plésiat P, Talon D, Bertrand X. Emergence of extensive-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a French university hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis,* 2009; 28(10):1217-22.
32. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-betalactamases:the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev*, 2005; 18(2):306-25.
33. Wenzel R, Bearman G, Brewer T, Butzler JP. Prevention and Control of Nosocomial Infections, Marc F, Force La, Infection control in the Hospitals, 4rd edition, U.S.A, International Society for Infectious Diseases, 2008:283-7.
34. Willmann M, et al. Effect of metallo-β-lactamase production and multidrug resistance on clinical outcomes inpatients with *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection: a retrospective cohortstudy. *BMC Infec Dis*, 2013; 13:515-23.
35. Yoshida H, Nakamura M, Bogaki M, Nakamura S. Proportion of DNA gyrase mutants among quinolone-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*.*antimicrob Agents Chemother*, 1999; 34(6):1273–5.
36. Yousefi S, Nahaei M, Farajnia S, Ghojazadeh M, Akhi M, Sharifi Y, Milani M, Ghotaslou R. Class 1 integron Imipenam resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* : prevalence and antibiotic susceptibility. *Iran J Microbiol.* 2010; 2(3):115-21.
37. Zafer MM, Al-Agamy MH, El-Mahallawy HA, Amin MA, Ashour SED. Dissemination of VIM-2 producing *Pseudomonas aeruginosa* ST233 at tertiary care hospitals in Egypt. *BMC Infectious Diseases*, 2015; 15(122):1-7.