

Investigation the Frequency of Metallo-Beta-Lactamase-Producing Microbial Resistance Genes in Pseudomonas Aeruginosa Isolates in Zare Burn and Psychiatric Hospital, Sari

Golnar Rahimzadeh¹
Reza Valadan²
Mohammad Shariatniya³
Mohammad Ahanjan⁴

¹Assistant Professor, Pediatric Infectious Diseases Research Center, Communicable Diseases Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

²Assistant Professor, Molecular and Cell Biology Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Medical Student, Student Research Committee, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Professor, Antimicrobial Resistance Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received October 26, 2023, Accepted November 19, 2023)

Abstract

Background and purpose: *Pseudomonas aeruginosa* is a significant contributor to hospital-acquired infections, including urinary infections, bacteremia, pneumonia, and burn wound infections. Due to the significant role of carbapenems in treating infections that are resistant to conventional antibiotics, it is necessary to identify the prevalence and resistance patterns of pathogens that cause hospital infections. This will help to prevent the spread of microbial resistance, and subsequently, reduce the death rate caused by such infections. Therefore, the aim of the present study is to determine the occurrence of metallo-beta-lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Sari hospitals.

Materials and methods: This cross-sectional study included 150 isolates of *Pseudomonas aeruginosa* as clinical samples that were collected from patients from the burn department of Zare Hospital, Sari city. To determine the antibiotic sensitivity, the disk diffusion method was used. Additionally, PCR method was employed to examine the prevalence of beta-lactamase genes blaVIM-1 and blaIMP-1 in the isolates.

Results: Based on the antibiotic sensitivity results, it was found that the highest resistance was observed to gentamicin, ceftazidime, imipenem, ciprofloxacin, amikacin, meropenem, cefepime, ceftriaxone, and calcitin. The data analysis also revealed that the frequencies of blaVIM-1 and bla IMP-1 genes were detected in isolates of 45% and 55%, respectively.

Conclusion: The frequency of *Pseudomonas aeruginosa* strains carrying the MBLs genes is increasing in Zare Hospital in Sari. The findings of the study strongly suggest that there is necessary to prevent the experimental and indiscriminate administration of carbapenems in intensive care and burn departments of hospitals.

Keywords: nosocomial infection, metallobeta-lactamase (MBLs), *Pseudomonas aeruginosa*

J Mazandaran Univ Med Sci 2023; 33 (Supple 2): 303-308 (Persian).

Corresponding Author: Mohammad Ahanjan - Antimicrobial Resistance Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (Email: ahanjan2007@gmail.com)

بررسی فراوانی ژن های مقاومت میکروبی مولد متالوبتالاکتاماز در ایزوله های *پسودوموناس آئروژینوزا* در بیمارستان سوختگی و روانپزشکی زارع، ساری

گلنار رحیم زاده^۱رضا ولدان^۲محمد شریعت نیا^۳محمد آهانجان^۴

چکیده

سابقه و هدف: *پسودوموناس آئروژینوزا* یکی از عوامل مهم در ایجاد عفونت های بیمارستانی مانند عفونت ادراری، باکتری می، پنومونی و عفونت زخم سوختگی است. با توجه به اهمیت ویژه کاربامپنم ها در درمان عفونت های مقاوم به آنتی بیوتیک های مرسوم و همچنین تجویز غیر منطقی و تجربی آنتی بیوتیک ها لازم است شیوع و الگوی مقاومت به آنتی بیوتیک ها در پاتوژن های ایجاد کننده عفونت های بیمارستانی تعیین گردد تا گسترش مقاومت میکروبی، میزان مرگ و میر ناشی از عفونت های بیمارستانی به حداقل برسند. لذا مطالعه حاضر با هدف تعیین فراوانی ژن های متالوبتالاکتاماز در ایزوله های *پسودوموناس آئروژینوزا* در بیمارستان سوختگی و روانپزشکی زارع، ساری صورت گرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه توصیفی- مقطعی، ۱۵۰ ایزوله *پسودوموناس آئروژینوزا* از نمونه های بالینی بیمارستان سوختگی بیمارستان آموزشی- درمانی زارع، شهرستان ساری جمع آوری شدند. حساسیت آنتی بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن انجام شد. شیوع ژن های بتالاکتاماز *blaIMP-1*، *blaVIM-1* در ایزوله ها با استفاده از PCR انجام شد.

یافته ها: طبق نتایج حساسیت آنتی بیوتیکی، بیشترین درصد مقاومت به ترتیب به جنتامایسین ۸۵ درصد، سفنازیدیم ۸۴ درصد، ایمی پنم ۸۳ درصد، سپیروفلوکساسین ۸۰ درصد، سفپییم ۷۹ درصد، آمیکاسین ۷۸ درصد، مروپنم ۷۱ درصد، کلیسیتین ۱۰ درصد مشاهده شد. فراوانی ژن های *blaIMP-1*، *blaVIM-1* به ترتیب ۴۵ و ۵۵ درصد در ایزوله ها شناسایی شدند.

استنتاج: فراوانی سویه های *پسودوموناس آئروژینوزا* حامل ژن متالوبتالاکتاماز (MBLs) در بیمارستان زارع در شهرستان ساری در حال افزایش است. در بخش مراقبت های ویژه و بخش سوختگی بیمارستان ها باید از تجویز تجربی و بی رویه کاربامپنم ها خودداری نمود.

واژه های کلیدی: عفونت بیمارستانی، متالوبتالاکتاماز (MBLs)، *پسودوموناس آئروژینوزا*

مقدمه

عفونت های بیمارستانی یکی از معضلات مطرح پزشکی در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه می باشد که موجب گسترش بیماری های عفونی در جامعه می گردد (۱، ۲).

E-mail: ahanjan2007@gmail.com

مؤلف مسئول: محمد آهانجان - ساری: دانشگاه علوم پزشکی مازندران، مرکز مقاومت های میکروبی

۱. استادیار، مرکز تحقیقات عفونی اطفال، پژوهشکده بیماری های واگیر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. استادیار، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی و سلولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳. دانشجوی پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۴. استاد، مرکز مقاومت های میکروبی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۸/۴ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۲/۸/۶ تاریخ تصویب: ۱۴۰۲/۸/۲۸

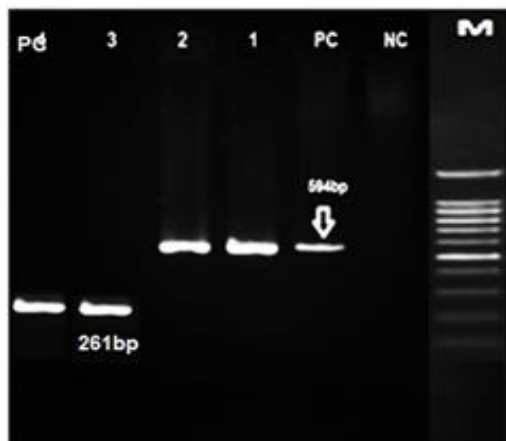
آنروژینوزا در بیمارستان سوختگی و روانپزشکی زارع در شهرستان ساری صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی-مقطعی، طی سال‌های ۱۳۹۵-۱۳۹۶ در بیمارستان سوختگی و روانپزشکی زارع شهرستان ساری انجام گرفت. پس از کسب کد اخلاق از دانشگاه علوم پزشکی مازندران (کد اخلاق REC. IR.MAZUMS.1395.2277) تعداد ۱۵۰ نمونه بالینی (زخم، خلط، ادرار و خون) از بیماران بستری در بیمارستان جمع‌آوری گردید. معیار ورود شامل بیماران دچار سوختگی و بستری در بیمارستان که دچار عفونت بیمارستانی بودند در نظر گرفته شد. معیار خروج شامل بیماران دچار سوختگی که مبتلا به عفونت بیمارستانی نبودند. سویه‌های *پسودوموناس آنروژینوزا* با انجام تست‌های مرسوم میکروبی شامل: رشد در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد، کاتالاز، اکسیداز، تست OF و IMViC تایید شدند (۱۴،۱۳) حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *پسودوموناس آنروژینوزا* با استفاده از روش (Kirby-Bauer) و بر اساس دستورالعمل CLSI (clinical laboratory standard institute) انجام شد. آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه شامل سیپروفلوکساسین (۵۰ μg)، ایمپی‌نم (۱۰ μg)، مروپنم (۱۰ μg)، سفپیم (۵۰ μg)، سفتازیدیم (۳۰ μg)، جنتامیسین (۱۰ μg)، آمیکاسین (۳۰ μg) بودند. همچنین جهت تعیین حساسیت ایزوله‌ها به کلیستین، بر اساس دستورالعمل CLSI (clinical laboratory standard institute) تست ماکرودایلوشن (MIC) انجام شد (۱۴،۱۳). بررسی فنوتیپی تولید متالوبتالاکتاماز به روش دیسک ترکیبی انجام شد. از دیسک ایمپی‌نم (۱۰ μg) به تنهایی و دیسک ترکیبی ایمپی‌نم - EDTA (۱۰ μg-۷۵۰ μg) استفاده شد. افزایش قطر هاله عدم رشد ≤ 7 در اطراف دیسک ترکیبی ایمپی‌نم - EDTA (۱۰ μg-۷۵۰ μg) در مقایسه با دیسک ایمپی‌نم تنها نشان‌دهنده تولید بتالاکتاماز می‌باشد (۱۴،۱۳).

پسودوموناس آنروژینوزا، به طور فزاینده به عنوان عامل مهم عفونت‌های بیمارستانی به خصوص در بخش‌های مراقبت‌های ویژه و سوختگی گسترش یافته است (۴،۳). درمان عفونت‌های ایجاد شده توسط این باکتری به علت مقاومت بالایی که به اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها دارد مشکل است. مقاومت آنتی‌بیوتیکی در *پسودوموناس آنروژینوزا* می‌تواند با منشا کروموزومی و یا اکتسابی با منشا پلاسمیدی باشد (۶،۵). کارباپنم‌ها به عنوان مهم‌ترین و آخرین خط درمان عفونت‌های ناشی از *پسودوموناس آنروژینوزا* محسوب می‌شوند (۷). در عصر حاضر با ظهور و گسترش سویه‌های مولد متالوبتالاکتامازها، درمان عفونت‌های ناشی از *پسودوموناس آنروژینوزا* به مشکل بزرگ جهانی تبدیل شده است. متالوبتالاکتامازها، طیف وسیعی از بتالاکتام‌ها از جمله سفالوسپورین‌های (نسل سوم و پنجم) کارباپنم‌ها و پنیسیلین‌ها را هیدرولیز می‌نمایند. هم‌چنین باعث ایجاد مقاومت در آمینوگلیکوزیدها می‌شوند (۸-۱۰). کارباپنم‌های کلاس B از متالوبتالاکتامازها طراحی شده اند، که بر اساس ساختار مولکولی به ۶ نوع AIM، SPM، GIM، SIM، IMP و UIM که به VIM، SPM، IMP تقسیم می‌شوند. از مهم‌ترین متالوبتالاکتامازها از نظر کلینیکی به وسیله ژن‌های blaSPM، blaVIM، blaIMP کد می‌شوند. حداقل ۹۴ نوع VIM و ۱۳ نوع IMP متفاوت، تعیین هویت شده‌اند (۱۲،۱۱). با توجه به اهمیت ویژه کارباپنم‌ها در درمان عفونت‌های حاصل از *پسودوموناس آنروژینوزا* با مقاومت چندگانه، ظهور و گسترش مقاومت میکروبی ناشی از متالوبتالاکتامازها به دلیل تجویز تجربی آنتی‌بیوتیک‌ها (۱۳)، لازم است شیوع متالوبتالاکتاماز و الگوی مقاومت به کارباپنم‌ها در پاتوژن‌های ایجادکننده عفونت‌های بیمارستانی در بیمارستان‌های هر منطقه بررسی و تعیین گردد تا گسترش مقاومت به کارباپنم‌ها، میزان مرگ و میر ناشی از عفونت‌های بیمارستانی، به حداقل برسند. لذا مطالعه حاضر با هدف تعیین فراوانی ژن‌های مولد متالوبتالاکتامازها در ایزوله‌های *پسودوموناس*

ژن های bla_{VIM-1}، ۴۵ درصد حامل ژن bla_{IMP-1} بودند (تصویر شماره ۱).



تصویر شماره ۱: الکتروفورز محصول PCR ژن های bla_{VIM}.
 PC: کنترل مثبت، NC: کنترل منفی، M: bla_{IMP} (594bp) (261bp)
 لدر 100-2000 bp، شرایط الکتروفورز: آگارز ۱ درصد، ولتاژ 100V

باکتری های مولد متالو بتالاکتاماز و عامل عفونت های بیمارستانی مسئول طولانی شدن دوره عفونت، عدم درمان با آنتی بیوتیک های گروه بتالاکتام و کارباپنم ها سبب افزایش مرگ و میر می گردند (۱۷، ۱۵). همچنین در مطالعه احمد و همکاران (۱۸)، در مصر از ۵۰ ایزوله پسودوموناس آئروژینوزا مقاوم به ایمی پنم، ۱۸ درصد از ایزوله ها مولد متالوبتالاکتاماز بودند که از میان آنها ۲۶ درصد دارای ژن bla_{IMP} و ۳۰ درصد حامل ژن KPC بودند. دلیل این تفاوت ممکن است ناشی از تفاوت منطقه ای و الگوی مصرف آنتی بیوتیکی باشد.

در مطالعه فاضلی و همکاران، در شهر اصفهان ۹۴ درصد از ایزوله های پسودوموناس آئروژینوزا به آنتی بیوتیک های ایمی پنم، پیراسیلین و سیپروفلوکساسین مقاوم بودند و تمامی سویه ها نیز به آنتی بیوتیک های

جهت تعیین ژن های متالوبتالاکتاماز، توالی پرایمر ژن های bla_{VIM-1}، bla_{IMP-1} و شرایط تکثیر ژن های مذکور در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. حجم نهایی مخلوط واکنش PCR، ۲۰ μl تهیه شد و شامل: (۱۰ μl) 2X Taq RED Master Mix (AMPLIQON) (۲ μl) DNA الگو، (۷ μl) آب مقطر و (۱ μl) پرایمر تهیه شد. برای تایید ژن های bla_{VIM1} از ژنوم سویه استاندارد پسودوموناس آئروژینوزا (ATCC NO. 27853) و برای تایید ژن bla_{IMP-1} از ژنوم سویه استاندارد کلبسیلا پنومونیه (ATCC NO.7881) استفاده شد.

یافته ها و بحث

در مطالعه حاضر، تعداد ۱۵۰ ایزوله پسودوموناس آئروژینوزا از نمونه بالینی بیماران دچار سوختگی و مبتلا به عفونت بیمارستانی در بیمارستان سوختگی زارع تایید شدند. نمونه های بالینی از ۷۴ درصد بیمار مرد و ۲۶ درصد بیمار زن جمع آوری شدند. دامنه سنی بیماران بین ۳۱ تا ۴۰ سال بود. بیشترین فراوانی ایزوله ها بر حسب نوع نمونه به ترتیب مربوط به زخم، خلط، ادرار و خون بود. براساس نتایج حاصل از آنتی بیوگرام، بیشترین مقاومت سویه های به دست آمده نسبت به جنتامایسین (۸۵ درصد)، سفتازیدیم (۸۴ درصد)، ایمی پنم (۸۳ درصد)، سیپروفلوکساسین (۸۰ درصد)، سفیپیم (۷۹ درصد)، آمیکاسین (۷۸ درصد)، مروپنم (۷۱ درصد) مشاهده شد. براساس نتایج ماکرودایلوشن کمترین میزان مقاومت به کلستین (۱۰ درصد) مشاهده شد. ۵۰ درصد از ایزوله ها در تست دیسک ترکیبی، تولید کننده آنزیم متالوبتالاکتاماز بودند. نتایج حاصل از آزمون PCR نشان داد، ۵۵ درصد از ایزوله ها حامل ژن

جدول شماره ۱: توالی پرایمرها و شرایط تکثیر ژن های مولد متالوبتالاکتاماز (۱۴-۱۳)

ژن	توالی پرایمر (5' to 3')	محصول (bp) PCR	initial denaturation	denaturation	annealing	extension	cycles	Final extension
VIM-1-F VIM-1-R	F- AGTGGTGAGTATCCGACAG R- ATGAAAGTGGGAGAGAC	261 bp	95°C / 2 min	93°C / 30 S	60°C / 30 S	72°C / 45 S	30	72°C / 10 min
IMP-1-F IMP-1-R	F-ACC GCA GCA GAG TCT TTT R- ACA ACC AGT TTT GCC TTA	594 bp	95°C / 2 min	93°C / 30 S	60°C / 30 S	72°C / 45 S	30	72°C / 10 min

آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها باشد. از محدودیت‌های مطالعه حاضر به پایین بودن حجم نمونه، بررسی سویه مولد بتالاکتاماز در دیگر بیمارستان‌های مستقر در شهرستان ساری و بررسی ژن‌های مولد بتالاکتاماز با تنوع بیش‌تر می‌توان اشاره نمود. تولید متالوبتالاکتامازها یکی از مکانیسم‌های مهم در مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کاربامپنم است. با توجه به افزایش روز افزون سویه‌های مولد متالوبتالاکتاماز نگرانی در مورد شکست درمانی برای این سویه‌ها افزایش یافته است. بنابراین علاوه بر دقت در تجویز آنتی‌بیوتیک و جلوگیری از مصرف بی‌رویه آن، شناسایی و بررسی سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها و سویه‌های مولد متالوبتالاکتاماز در میان ایزوله‌های *پسودوموناس* ضروری می‌باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مطالعه بر خود لازم می‌دانند از همه بزرگوارانی که در اجرایی شدن این طرح یاری نمودند، به‌ویژه کارکنان آزمایشگاه بیمارستان زارع و هم‌چنین آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده پزشکی ساری، صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

سفت‌زیدیم و تیکارسیلین مقاومت ۱۰۰ درصد نشان دادند و بین مصرف داروهای ضد *پسودوموناس* (آمیکاسین، سیپروفلوکساسین، سفت‌زیدیم و ایمپنم) و گسترش سویه‌های مقاوم *پسودوموناس آئروژینوزا* رابطه معنی‌داری وجود داشته است (۲۰).

Pitout و همکاران، طی مطالعه‌ای در سال‌های ۲۰۰۲ تا ۲۰۰۶ نشان دادند که ۳۹ درصد از ایزوله‌های *پسودوموناس آئروژینوزا* مولد متالوبتالاکتاماز بودند و از این تعداد ۵۶ درصد حاوی ژن blaVIM و ۴ درصد حاوی ژن blaIMP بود (۲۱). در همین راستا رحیم زاده ترابی و همکاران، میزان شیوع ژن‌های بتالاکتاماز blaVIM-1 و blaIMP-1 را در سویه‌های *پسودوموناس آئروژینوزا* در استان اصفهان بررسی کردند آن‌ها بیش‌ترین مقاومت نمونه‌های بالینی را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین، کاربونی‌سیلین، ایمپنم، آمپی‌سیلین گزارش کردند. هم‌چنین ۶۳ درصد سویه‌ها شامل ژن بتالاکتاماز blaIMP-1 و هیچ‌کدام از سویه‌ها دارای ژن blaVIM نبودند (۱۵). علت تفاوت الگوی ژنوتیپی در مناطق مختلف می‌تواند به دلیل تفاوت در الگوی مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و تفاوت در الگوی مقاومت

References

1. Stuart E, Chris C. Nosocomial infections in the ICU. *Anaesth Intensive Care Med* 2019; 1(20): 14-18.
2. Darvishpoor K, heshmati H, Rezaei Manesh MR, Mir hasani M. Prevalence of nosocomial infections and microbial causes in Torbat heydariyeh 9dey educational and clinical hospital in 2012 and 2013. *Iran J Med Microbiol* 2016; 10(1): 93-96.
3. Rahimzadeh G, Rezaei MS. Detection extended spectrum beta lactamase and carbapenemase producing Enterobacteriaceae isolates from clinical samples; Narrative review. *J Isfahan Med Sch* 2022; 40(688): 743-758.
4. Rahimzadeh G, Farshidi F, MS Rezaei. Genotypic Patterns of Multidrug Resistant *Acinetobacter baumannii*: A Systematic Review. *Adv Biomed Res* 2023; 12: 56-72.
5. 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.
6. Amini K, Mobasser 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): 41-45.

7. Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs* 2007; 67(3): 351-368.
8. 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.
9. 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): 177-192.
10. 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): 1567-1573.
11. 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.
12. 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.
13. Azimi L, Talebi M, Pourshafie M-R, Owlia P, Lari AR. Characterization of carbapenemases in extensively drug resistance *Acinetobacter baumannii* in a burn care center in Iran. *Int J Mol Cell Med* 2015; 4(1): 46-53.
14. Benmahmod AB, Said HS, Ibrahim RH. Prevalence and Mechanisms of Carbapenem Resistance Among *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates in Egypt. *Microb Drug Resist* 2019; 25(4): 480-488.
15. Rahimzadeh Torabi L, Doudi M, Golshani Z. The frequency of blaIMP and blaVIM carbapenemase genes in clinical Isolates of *pseudomonas aeruginosa* in Isfahan medical centers. *Medical Journal Of Mashhad University Of Medical Sciences* 2016; 59(3): 139-147 (Persian).
16. Taghinejad J, Hosseinzadeh M, Molayi Kohneshahri S, Javan Jasor V. *Pseudomonas aeruginosa*: A biological review. *Laboratory & Diagnosis* 2017; 8(34): 67-82.
17. Hashemi A, Fallah F, Taherpour A, Goudarzi H, Tarashi S, Erfanimanesh S, et al. Detection of Metallo-beta-Lactamases, Extended-spectrum Beta-lactamases (ESBLs), Outer Membrane Porins among *Klebsiella Pneumoniae* Strains Isolated from Hospitalized Patients in Tehran. *J Adv Med Biomed Res* 2015; 23(98): 89-102.
18. 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.
19. 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): 1894-1901.
20. Fazeli H, Moslehi Z, Irajian G, Salehi M. Determination of Drug resistance patterns and detection of bla-VIM gene in *Pseudomonas aeruginosa* strains Isolated from burned patients in the Emam Mosa Kazem hospital, Esfahan, Iran (2008-9). *Iran J Med Microbiol* 2010; 3(4): 1-8.
21. Pitout JD, Gregson DB, Poirel L, McClure J-A, Le P, Church DL. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo- β -lactamases in a large centralized laboratory. *J Clin Microbiol* 2005; 43(7): 3129-3135.