

The study of the antibiotic resistance pattern of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from hospitalized patients in Arak

Rahimi B(M.Sc)¹, Shojapour M(M.Sc)², Sadeghi AR(PhD)^{3*}, Pourbabaei AA(PhD)⁴

1- Department of Microbiology, Islamic Azad University of Qom, Qom, Iran

2- Molecular and Medicine Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

3- Department of Biochemistry and Genetics, Molecular and Medicine Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

4-Department of biotechnology, University of Tehran,Karaj,Iran

Received: 12 Aug 2011, Accepted: 25 Oct 2011

Abstract

Background: *Pseudomonas aeruginosa* is a human opportunistic pathogen which is considered one of the agents causing nosocomial infection. Recent studies have reported increased resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to imipenem. The aim of this study was to determine resistance to antipseudomonal antibiotics including imipenem in *Pseudomonas aeruginosa* strains.

Materials and Methods: In this cross-sectional study, 100 *Pseudomonas aeruginosa* strains obtained from clinical samples of patients in hospitals in Arak, Iran, were identified and isolated through microbiological methods, including Gram staining, oxidase test, Indol test, and oxidative-fermentative test. Then antibiotic susceptibility test was performed for imipenem, meropenem, gentamicin, amikacin, ciprofloxacin, and ceftazidime by disk diffusion method according to NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Minimum inhibitory concentration (MIC) was done for determining imipenem-resistant strains

Results: Antibiotic susceptibility test showed that resistance rates to imipenem, meropenem, gentamicin, amikacin, ciprofloxacin, and ceftazidime were 35%, 35%, 14%, 9%, 23% and 15%, respectively. Also, MIC test showed that 30 strains were resistant to imipenem, 27 to ceftazidime, 35 to cefepime, and 35 to ciprofloxacin.

Conclusion: The results of this study indicated a high rate of antibiotics resistant of *Pseudomonas aeruginosa* strains to different antibiotic groups. Therefore, new and more effective methods should be found for controlling *Pseudomonas* infections and preventing the outbreak of its antibiotic-resistant strains.

Keywords: Antibiotic, imipenem resistance, *Pseudomonas aeruginosa*

*Corresponding author:

Address: Molecular and Medicine Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

Email: sadegha@arakmu.ac.ir

بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه‌های پseudomonas آیروزینوزا جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان های اراک

بهاره رحیمی¹، مانا شجاع پور²، عبد الرحیم صادقی³، احمدعلی پوربابایی⁴

1- کارشناس ارشد میکروپ شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران

2- دانشجوی دکتری تخصصی پزشکی مولکولی، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

3- - استادیار، دکترای تخصصی ژنتیک، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، گروه بیوشیمی و ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

4- استادیار، دکترای تخصصی میکروپ شناسی، گروه زیست فن آوری، دانشگاه تهران، کرج، ایران

تاریخ دریافت: 90/5/22 تاریخ پذیرش: 90/8/4

چکیده

زمینه و هدف: پseudomonas آیروزینوزا پاتوژن فرصت طلب انسانی است و از عوامل عفونت بیمارستانی محسوب می‌شود. مطالعات اخیر افزایش مقاومت پseudomonas آیروزینوزا به ایمی پنم را گزارش کرده‌اند. هدف این مطالعه تعیین الگوی مقاومت باکتری به آنتی بیوتیک‌های ضد پseudomonas از جمله ایمی پنم می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی، 100 سویه پseudomonas آیروزینوزا از نمونه‌های بالینی بیماران بستری به دست آمد، این سویه‌ها با روش‌های میکروپ شناسی و بیوشیمیایی شامل رنگ آمیزی گرم، تست اکسیداز، تست اندول، اکسیداتیو- فرمنتاتیو SIM و TSI شناسایی و ایزوله شدند. تعیین حساسیت به روش دیسک دیفیوژن برای 6 آنتی‌بیوتیک ایمی پنم، مروپنم، جنتامیسین، آمیکاسین، سیپروفلوکساسین و سفنازیدیم، طبق استانداردهای موجود NCCLS انجام شد و در مرحله بعد نمونه‌های مقاوم به ایمی پنم به روش MIC مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: تست تعیین الگوی حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها مشخص کرد که درصد مقاومت به ایمی پنم، مروپنم، جنتامیسین، آمیکاسین، سفنازیدیم و سیپروفلوکساسین به ترتیب شامل 35، 35، 14، 9، 23 و 15 درصد می‌باشد. هم‌چنین در تست MIC تعداد سویه‌های مقاوم به ایمی پنم، سفنازیدیم، سفپیپیم و سیپروفلوکساسین به ترتیب 30، 27، 35 و 35 بود.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان دهنده میزان بالای مقاومت در سویه‌های پseudomonas آیروزینوزا به گروه‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی است. بنابراین به منظور کنترل عفونت و جلوگیری از شیوع بیشتر سویه‌های مقاوم باید به دنبال راه کارهای مناسبی گشت.

واژگان کلیدی: آنتی بیوتیک، مقاومت به ایمی پنم، پseudomonas آیروزینوزا

*نویسنده مسئول: اراک، دانشگاه علوم پزشکی اراک، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی

Email: sadegha@arakmu.ac.ir

مقدمه

پسودوموناس آیروژینوزا یک پاتوژن شناخته شده می باشد که به دلیل انتشار وسیع و مقاومت به آنتی بیوتیکها موجب عفونت های بیمارستانی گشته و درمان عفونت های ایجاد شده توسط آن مشکل می باشد (1، 2). در سال های اخیر تعداد سویه های پسودوموناس آیروژینوزا مقاوم افزایش یافته و در برخی مناطق، سویه هایی یافت شده که به انواع آنتی بیوتیک های بتالاکتام مقاومت نشان داده اند (3). در این باکتری چندین مکانیسم مقاومت به کرباپنمها شامل فقدان پورین OprD، بیان بالای پمپ های ترشحی، نفوذ ناپذیری و تولید بتالاکتامازهایی مانند متالوبتالاکتامازها شناخته شده است (4، 5). تولید بتالاکتامازها مکانیسم عمده مقاومت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام است. این آنزیمها پیوند آمیدی حلقه بتالاکتام را برش داده و باعث غیرفعال شدن این آنتی بیوتیکها می گردند. طبق طبقه بندی آمبلر، بتالاکتامازها به چهار کلاس تقسیم می شوند؛ کلاس های C، D و A از نوع سرین-بتالاکتامازها هستند، بدین معنی که در جایگاه فعال آنها سرین قرار دارد و بتالاکتامازهای کلاس B یا متالوبتالاکتامازها که وجود یک یا دو یون روی (Zn)، در جایگاه فعال آنها ضروری است. متالوبتالاکتامازها توانایی غیرفعال سازی همه آنتی بیوتیک های بتالاکتام به جز مونوباکتام را دارند (6، 7). هدف از این مطالعه یافتن فراوانی سویه های پسودوموناس آیروژینوزا مقاوم به آنتی بیوتیک ایمی پنم در عفونت های بیمارستانی شهر اراک بوده است.

مواد و روش ها

در این مطالعه توصیفی، 100 پسودوموناس آیروژینوزا مختلف در سال های 89 الی 90 از بخش های مختلف بیمارستان بستری در بیمارستان های اراک جدا شدند. این نمونه ها از کشت های خون، ادرار، خلط و زخم جدا شدند. پس از کشت مجدد این سویه ها، تست های میکروبی شامل رنگ آمیزی گرم، تست اکسیداز، تست اکسیداتیو-

فرمانتاسیون، تست TSI و SIM جهت شناسایی جنس و گونه باکتری صورت گرفت (8).

جهت تعیین الگوی حساسیت دارویی، حساسیت به 6 آنتی بیوتیک (هایمدیا-هند) ایمی پنم، مروپنم، آمیکاسین، جنتامیسین، سیپروفلوکساسین و سفنازیدیم به روش کربی-بایر انجام شد. مطابق با استاندارد NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) باکتریها در محیط مولر هینتون برات (لیوفیلکوم-ایتالیا) کشت داده شده و سپس کدورت آنها با محلول 0/5 مک فارلند مورد سنجش قرار گرفت. در صورت برابر بودن کدورت محیط با محلول 0/5 مک فارلند، تعداد باکتریها برابر با 1×10^8 خواهد بود. بعد از گرماگذاری نمونه ها به مدت 2 الی 3 ساعت در محیط مولر هینتون آگار (لیوفیلکوم-ایتالیا) به صورت چمنی کشت داده شدند. سپس دیسک های آنتی بیوتیک روی محیط مذکور قرار گرفته و به مدت 18 الی 24 ساعت گرماگذاری شدند و قطر هاله های ایجاد شده اطراف دیسک های آنتی بیوتیک اندازه گیری شد. از سویه پسودوموناس آیروژینوزا (ATCC 27853) به عنوان شاهد مثبت در این تست استفاده گردید (9).

حدافل غلظت مهارکنندگی (Minimum Inhibitory Concentration-MIC) کمترین غلظتی از آنتی بیوتیک می باشد که باعث مهار رشد باکتری گردیده و با عدم مشاهده کدورت در لوله مشخص می شود. به بیان ساده تر، MIC همان غلظت آنتی بیوتیک در اولین لوله ای می باشد که در آن رشدی از باکتری دیده نمی شود. این آزمون به روش Microdilution طبق استانداردهای NCCLS و با 4 آنتی بیوتیک ایمی پنم، سفنازیدیم، سفپیم و سیپروفلوکساسین در سویه های مقاوم به ایمی پنم انجام شد. با استفاده از محیط مولر هینتون برات 2X به ازای هر 1000 میلی لیتر از این محیط کشت، 1/25 میلی لیتر از محلول کلرید کلسیم (CaCl₂.2H₂O) و 2/5 میلی لیتر از محلول کلرید منیزیم (MgCl₂.6H₂O) به محیط کشت اضافه شد و سری های رقت از عامل ضد میکروبی (به حجم 1-2

که درصد مقاومت به ایمی پنم، مروپنم، جنتامیسین، آمیکاسین، سفنازیدیم و سیپروفلوکسازین به ترتیب 35، 35، 14، 9، 23 و 15 درصد می باشد. جدول 1 درصد فراوانی سویه های مقاوم، حد واسط و حساس را نشان می دهد.

حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC): بر

اساس استانداردهای NCCLS سویه هایی که $MIC \geq 16$ (میکروگرم بر میلی لیتر) نسبت به ایمی پنم دارند مقاوم تلقی می شوند (11، 12). در این بررسی از 35 سویه مقاوم به ایمی پنم، 30 سویه $MIC \geq 16$ نسبت به این آنتی بیوتیک، 27 سویه $MIC \geq 32$ نسبت به سفنازیدیم، 35 سویه $MIC \geq 4$ نسبت به سفپیم و 35 سویه $MIC \geq 4$ را نسبت به سیپروفلوکسازین نشان دادند. جدول 2 نشان دهنده مقادیر MIC با محدوده غلظت 2 الی 256 آنتی بیوتیک ها می باشد.

میلی لیتر) تهیه شد. قبل از افزودن این محیط کشت به میکرو پلیت، سوسپانسیون استاندارد از باکتری مورد نظر به لوله حاوی مولر هیتون برات افزوده تا غلظت نهایی برابر 5×10^5 Cfu/mL به دست آید، ضمناً یک لوله کنترل (حاوی محیط کشت بدون باکتری) نیز در هر آزمون مورد استفاده قرار گرفت (10).

یافته

100 سویه پseudomonas آیروزینوزا از بخش های گوناگون شامل خون، ادرار، خلط، زخم و سایر موارد جدا شدند که فراوانی آنها به ترتیب 33، 22، 24، 14 و 7 درصد بود.

الگوی حساسیت به مواد دارویی: آزمون

تعیین الگوی حساسیت به آنتی بیوتیک ها مشخص ساخت

جدول 1. فراوانی (درصد) سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک های مختلف

فراوانی	ایمی پنم	مروپنم	جنتامیسین	آمیکاسین	سیپروفلوکسازین	سفنازیدیم
مقاوم	35	35	14	9	15	23
حد وسط	4	2	5	2	5	4
حساس	61	63	81	89	80	73

جدول 2. حداقل غلظت مهارکنندگی (میکروگرم بر میلی لیتر)

محدوده غلظت ها	2	4	8	16	32	64	128	256	> 256
ایمی پنم	1	1	3	1	5	2	0	7	15
سفنازیدیم	1	1	4	2	4	5	3	2	13
سفپیم	0	0	3	4	0	3	2	3	20
سیپروفلوکسازین	0	4	9	0	4	1	3	0	14

بحث

روی پلازمید قرار داشت و از طریق کونژوگاسیون به pseudomonas آیروزینوزا منتقل گردیده بود. این آنزیم سوبستراهای زیادی دارد که شامل ایمی پنم، اکسی ایمینوسفالوسپورین ها، 7-متوکسی سفالوسپورین ها و پنی سیلین ها می شود (13). آلتوبارلاک و همکاران در 2003 تا 2004 در ترکیه، 120 سویه pseudomonas آیروزینوزا و 9 سویه اسینتوباکتر باومانی را از زخم های سوختگی بیماران مختلف جدا کردند. بررسی الگوی حساسیت نسبت به ایمی پنم و مروپنم به ترتیب 30/8 و 32/5 درصد مقاومت را در بین سویه های pseudomonas آیروزینوزا نشان داد (14). در

در این مطالعه از 100 سویه pseudomonas آیروزینوزا 35 سویه نسبت به آنتی بیوتیک ایمی پنم مقاومت نشان دادند. از بین 35 نمونه مقاوم به ایمی پنم 22 سویه از کشت های خون جدا شدند. مقایسه نتایج این بررسی و سایر بررسی ها، میزان مقاومت مشابهی را به ایمی پنم با اندکی تفاوت نشان می دهد.

واتاناب و همکاران در سال 1990 در ژاپن سویه ای از pseudomonas آیروزینوزا را یافتند که قادر به تولید بتا لاکتاماز و هیدرولیز ایمی پنم بود، ژن بتالاکتاماز

بررسی ما، 100 درصد سویه‌های مقاوم به ایمی پنم به سفیپیم نیز مقاوم بوده و 14 سویه نیز مقاومت بسیار بالا نشان داده‌اند ($MIC \geq 256$). بررسی‌های MIC در نقاط مختلف دنیا افزایش مقاومت پseudomonas آیروزینوزا به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها را نشان می‌دهد.

نتیجه گیری

با توجه به مقاومت بالای پseudomonas آیروزینوزا به انواع آنتی بیوتیک‌ها، تعیین و در نظر گرفتن الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در زمینه درمان ضروری می‌باشد. از طرفی به منظور جلوگیری از انتشار آلودگی و کنترل عفونت بیمارستانی، رعایت بهداشت فردی به ویژه در پرسنل مرتبط با بیمار (مانند شستشوی مرتب دست‌ها) و جداسازی بیماران مبتلا به سویه‌های مولد متالوبتالاکتاماز اهمیت دارد. هم‌چنین ایمن سازی می‌تواند راه کاری به منظور جلوگیری از انتشار عفونت‌های پseudomonas باشد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش بخشی از طرح تحقیقاتی شماره 485 و هم‌چنین قسمتی از پایان‌نامه خانم بهاره رحیمی دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی قم می‌باشد. بدین وسیله از دانشگاه علوم پزشکی اراک به دلیل پشتیبانی مالی و کلیه همکاری‌هایی که ما را در انجام این پژوهش یاری رساندند تشکر می‌نمایم.

منابع

1. Siarkou VI, Vitti D, Protonotariou E, Ikonmidis A, Sofianou D. Molecular epidemiology of outbreak-related *Pseudomonas aeruginosa* strains carrying the novel variant blaVIM-17 metallo- β -lactamase gene. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009; 53(4): 1325-30.
2. Sekiguchi JI, Asagi T, Miyoshi-Akiyama T, Kasai A, Mizuguchi Y, Araake M, et al. Outbreaks of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in community hospitals in Japan.

مطالعه‌ای دیگر در برزیل، روش فنوتیپی و ژنوتیپی تولید متالوبتالاکتاماز مورد مقایسه قرار گرفت. به این صورت که تولید متالوبتالاکتاماز به روش فنوتیپی در 69 پseudomonas آیروزینوزا مقاوم به ایمی پنم جدا شده از خون بررسی گردید و حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد نیز به روش microdilution مورد ارزیابی قرار داده شد. از بین تمامی این سویه‌ها، 34/5 درصد مقاوم به ایمی پنم گزارش گردید(15). خسروی و همکاران در سال 2008 در اهواز، فعالیت 6 ماده ضد میکروبی رایج از کرباپنم‌ها را علیه 100 سویه پseudomonas آیروزینوزا با روش انتشار در دیسک سنجیدند، که 41 سویه مقاوم به ایمی پنم گزارش شدند(16). همان‌طور که نتایج بررسی‌های مختلف در سال‌های گوناگون نشان می‌دهد، مقاومت به ایمی پنم در بین سویه‌های پseudomonas آیروزینوزا سیر صعودی داشته است. از دلایل این امر می‌توان به وجود آنزیم‌های بتالاکتامازی مختلف در این باکتری اشاره کرد که باعث هیدرولیز انواع گوناگون آنتی بیوتیک‌ها می‌شود(17-19). از عواملی که در کنترل مقاومت نقش دارد، درمان موثر با آنتی بیوتیک‌های مناسب است. بنابراین در عفونت‌های سخت ایجاد شده با پseudomonas آیروزینوزا باید از درمان ترکیبی استفاده شود، معمولاً یک آمینوگلیکوزید و پنی سیلین سنتزی مانند تیکارسیلین یا پیراسیلین تجویز می‌گردد(20). در این بررسی از بین 35 نمونه مقاوم به ایمی پنم، 30 سویه $MIC \geq 16$ نسبت به این آنتی بیوتیک داشته و مقاوم بودند. کاردوس و همکاران در سال 2007 در پرتغال، 15 سویه پseudomonas آیروزینوزا را از 5 کودک مبتلا به سیستمیک فیبروزیس جدا کردند و نتیجه MIC وجود 8 سویه مقاوم به ایمی پنم بود(21). طبق نتایج ما، از بین 35 نمونه، 18 سویه با مقاومت بالا به سفنازیدیم وجود داشت ($MIC \geq 128$) و این رقم میزان بالایی از مقاومت را نشان می‌دهد(22). در بررسی که توسط خوروش و همکاران در اصفهان بین سال‌های 2005 الی 2006 انجام شد(23)، 73/1 درصد از سویه‌های پseudomonas آیروزینوزا به آنتی‌بیوتیک سفیپیم مقاومت نشان داده‌اند و بر اساس نتایج حاصل از

- Journal of clinical microbiology. 2007; 45(3): 979-89.
3. Li H, Toleman MA, Bennett PM, Jones RN, Walsh TR. Complete Sequence of p07-406, a 24,179-Base-Pair Plasmid Harboring the blaVIM-7 Metallo- β -Lactamase Gene in a *Pseudomonas aeruginosa* Isolate from the United States. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008;52(9):3099-105.
 4. Khosravi Y, TeeTay S, Vadivelu J. Metallo-beta-lactamase-producing imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in a university teaching hospital in Malaysia: detection of IMP-7 and first identification of IMP-4, VIM-2, and VIM-11. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010;67(3):294-6.
 5. Bahar MA, Jamali S, Samadikuchaksaraei A. Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains carry metallo-[beta]-lactamase gene blaVIM in a level I Iranian burn hospital. *Burns*. 2010; 36(6):826-30.[persian]
 6. Bebrone C. Metallo-[beta]-lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochemical pharmacology*. 2007; 74(12): 1686-701.
 7. Juan C, Beceiro A, Gutiérrez O, Albertí S, Garau M, Pérez JL, et al. Characterization of the new metallo- β -lactamase VIM-13 and its integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Spain. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008; 52(10): 3589-96.
 8. Jawetz E, Melnik J, Adelberg E, Brooks G, Bustel J, Ornston L. *Medical Microbiology*. 20 edition appleton & Large, USA. Simmon&Schuster Company.1995; 16(2): 206-207.[Persian]
 9. Staneck J. Imipenem susceptibility testing with a commercially prepared dry-format microdilution tray. *Journal of clinical microbiology*. 1986;23(6):1134-5.
 10. Baron EJ, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC. *Diagnostic microbiology*. 11 ed: Philadelphia, Mosby; 2002.
 11. Cooper GL, Louie A, Baltch AL, Chu RC, Smith R, Ritz W, et al. Influence of zinc on *Pseudomonas aeruginosa* susceptibilities to imipenem. *Journal of clinical microbiology*. 1993; 31(9): 2366-70.
 12. Miyajima Y, Hiramatsu K, Mizukami E, Morinaga R, Ishii H, Shirai R, et al. In vitro and in vivo potency of polymyxin B against IMP-type metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *International journal of antimicrobial agents*. 2008;32(5):437-40.
 13. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1991;35(1):147-51.
 14. Altoparlak U, Aktas F, Celebi D, Ozkurt Z, Akcay MN. Prevalence of metallo-[beta]-lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from burn wounds and in vitro activities of antibiotic combinations against these isolates. *Burns*. 2005; 31(6):707-10.
 15. Franco MRG, Caiaffa-Filho HH, Burattini MN, Rossi F. Metallo-beta-lactamases among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian university hospital. *Clinics*. 2010; 65(9): 825-9.
 16. Khosravi AD, Mihani F. Detection of metallo-[beta]-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients in Ahwaz, Iran. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2008; 60(1): 125-8.[persian]
 17. Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Medecine et maladies infectieuses*. 2006;36(2):78-91.
 18. Bonomo RA, Szabo D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical infectious diseases*. 2006;43(Supplement 2): S49-56.
 19. Shojapour M, Shariati L, Karimi A, Zamanzad B. Prevalence of TEM-1 type beta-lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn infections using Duplex PCR in Shahrekord,2008. *Arak Medical University Journal (AMUJ)*. 2011;14(54):55-61.
 20. Cardoso O, Alves AF, Leitão R. Metallo- β -lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a cystic fibrosis patient. *International journal of antimicrobial agents*. 2008; 31(4):375-9.
 21. Shibata N, Doi Y, Yamane K, Yagi T, Kurokawa H, Shibayama K, et al. PCR typing

of genetic determinants for metallo- β -lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *Journal of clinical microbiology*. 2003; 41(12):5407-13.

22. Shibata N, Doi Y, Yamane K, Yagi T, Kurokawa H, Shibayama K, et al. PCR typing of genetic determinants for metallo- β -lactamases and integrases carried by gram-

negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *Journal of clinical microbiology*. 2003;41(12):5407-13.

23. Khorvash F, Mostafavizadeh K, Mobasherizadeh S, Behjati M, Salehi M. Emergence of cefepime resistance in gram-negative induced nosocomial infections. *Iranian Journal of Clinical Infectious Diseases*. 2009; 4(1):13-8.[persian]