● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ هفدهم، شمارهٔ ۳، ص ۲۱۴-۲۰۸، ۱۳۸۹

مقالهٔ پژوهشی

# ظهور مقاومت به ایمیپنم و وجود آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز در باسیل‌های گرم منفی مقاوم به چند دارو، جداشده از نمونه‌های کلینیکی شهر کرمان در سال ۱۳۸۷ – ۱۳۸۶

داود کلانتر[۱]، شهلا منصوری*[۲]، مژده رضوی[۳]

**خلاصه**

**مقدمه:** ایمیپنم از خانواده کاربا‌پنم‌ها و در مقابل بتالاکتامازها مقاوم می‌باشد. این دارو در درمان عفونت‌های حاصل از باکتری‌های گرم منفی مقاوم و دارای ژن‌های ESBL و AmpC به‌کار می‌رود. ظهور متالوبتالاکتامازها باعث ایجاد مقاومت به این دارو شده است. EDTA در شرایط برون‌تنی سبب مهار این آنزیم‌ها می‌گردد. هدف از این مطالعه بررسی شیوع مقاومت به ایمیپنم در باکتری‌های گرم منفی ایجادکننده عفونت‌های بیمارستانی و حضور متالوبتالاکتامازها در نمونه‌های مقاوم می‌باشد.

**روش:** حداقل غلظت مهارکنندگی نسبت به ایمیپنم برای ۲۷۶ ایزوله از باسیل‌های گرم منفی مقاوم به چند دارو با روش رقت در آگار تعیین شد. از سویه‌های باکتریایی *Escherichia coli* ATCC 259222، *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 و *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 به عنوان سوش استاندارد استفاده شد. برای تعیین متالوبتالاکتامازها از روش دیسک دیفیوژن به صورت دیسک ایمیپنم به‌تنهایی و همراه با EDTA M, ۰/۵ به مقدار ۱۰µl استفاده شد. افزایش قطر هاله عدم رشد≥ ۷mm در اطراف دیسک حاوی EDTA و ایمیپنم در مقابل دیسک ایمیپنم به‌تنهایی نشان دهنده حضور متالوبتالاکتاماز می‌باشد.

**یافته‌ها:** از مجموع ۲۷۶ نمونه شامل ۳۸ ایزوله کلبسیلا پنومونیه، ۱۶۹ ایزوله اشریشیاکلی و ۶۹ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا تولید کننده بتالاکتاماز، سه ایزوله مقاوم به ایمیپنم و دارای حداقل غلظت مهارکنندگی برابر با ۳۲µg/ml بودند، که در دو نمونه شامل کلبسیلا پنومونیه و یک نمونه سودوموناس آئروژینوزا با روش فنوتیپی آنزیم متالوبتالاکتاماز شناسایی شد.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به پیدایش متالوبتا لاکتامازها در سویه‌های مورد بررسی در این ناحیه مقاومت به این داروی مهم درمانی دور از انتظار نیست.

**واژه‌های کلیدی:** ایمیپنم، متالو بتالاکتاماز، باکتری گرم منفی، مقاومت دارویی

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی افضلی‌پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۲- استاد گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی افضلی‌پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۳- دانش‌آموخته میکروب‌شناسی

***نویسنده مسؤول، آدرس:** گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی افضلی‌پور، انتهای بلوار ۲۲ بهمن، کرمان● **آدرس پست الکترونیک:** smansouri@kmu.ac.ir

**دریافت مقاله:** ۱۳۸۸/۶/۹ **دریافت مقاله اصلاح شده :** ۱۳۸۸/۹/۲۱ **پذیرش مقاله:** ۱۳۸۸/۱۰/۱۶

**مقدمه**

پیدایش آنزیم‌های بتالاکتاماز در میان باکتری‌ها باعث پدیده مقاومت در میان بسیاری از آنها به‌ویژه باکتری‌های ایجادکننده عفونت‌های بیمارستانی شده و در نتیجه درمان عفونت‌های حاصل ازآنها را با مشکلات جدی روبرو ساخته است (۱). این آنزیم‌ها که بسیاری از آنها بتالاکتاماز با طیف اثر گسترده (ESBLs) نامیده می‌شوند، به چهار گروه اصلی A تا D تقسیم می‌شوند. گروه A که سبب هیدرولیز پنی‌سیلین و سفالوسپورین‌های با طیف اثر کم و وسیع می‌شوند، شامل TEM.1,TEM.2و SHV.1 بوده و تاکنون در باکتری‌هایی مانند اشریشیاکلی و کلبسیلاپنومونیه شناسایی شده‌اند. گروه B، شامل متالوبتالاکتامازهای وابسته به‌روی(Zn) می‌باشند که قادر به هیدرولیز کاربا‌پنم‌ها بوده ودر باکتری‌هایی مانند سودوموناس آئروژینوزا و سراشیامارسنس گزارش شده‌اند. گروهC، که از آنها می‌توان AmpC ها را نام برد، قادر به تجزیه سفومایسین‌ها می‌باشند و گروه D، بتالاکتامازهای با قدرت هیدرولیز زیاد مانند OXA بر علیه اکساسیلین و کلوکساسین بوده و اسید کلاولانیک به‌طور ضعیف از فعالیت آنها جلوگیری می‌کند (۲). ایمیپنم از اعضای دسته‌ای از داروهای بتالاکتام به‌نام کاربا‌پنم‌ها می‌باشد، که به آنزیم‌های بتالاکتاماز مقاوم بوده و در درمان عفونت‌های حاصل از باکتری‌های گرم منفی مقاوم و تولیدکننده ESBLs وAmpC به‌کار می‌رود، اما ظهور آنزیم‌های کاربا‌پنماز که گروهی از آنها متالوبتالاکتاماز نامیده‌می‌شوند و در گروه B از آنزیم‌های بتالاکتاماز قرار دارند، باعث بروز مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها شده‌اند (۳). متالوبتالاکتامازها آنزیم‌هایی هستند که توسط کروموزوم‌ها و یا پلاسمیدها کد می‌شوند و روی طیف وسیعی از داروهای بتالاکتام به‌ویژه کاربا‌پنم‌ها اثر گذاشته و باعث هیدرولیز آنها می‌شوند. این آنزیم‌ها در محیط *in vitro* توسط شلاتورهای فلزی مانند EDTA (اتیلن‌دی‌آمین تترااسیداستیک) و سدیم مرکاپتو استیک اسید مهارمی‌گردند، اما توسط مهارکننده‌هایی مانند اسید برونیک و اسید کلاولانیک مهار نمی‌شوند (۴). معرفی کاربا‌پنم‌ها به دنیای پزشکی به‌دلیل طیف وسیع فعالیت و پایداری آنها در برابر اکثر آنزیم‌های بتالاکتاماز یک موفقیت بزرگ در درمان عفونت‌های جدی باکتریایی مقاوم به بتالاکتام‌ها محسوب می‌شود (۵). مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های این کلاس از داروهای بتالاکتام توسط آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز یکی از عوامل اصلی مقاومت به کاربا‌پنم‌ها می‌باشد و گزارش مکتوبی از شیوع آنها در بین باسیل‌های گرم منفی این ناحیه وجود ندارد. لذا بررسی شیوع مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها توسط متالوبتالاکتامازها در مورد کلبسیلا پنومونیه، اشرشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا که جزئی از فلور طبیعی بدن بوده و نقش مهمی در ایجاد عفونت‌ها به‌ویژه عفونت‌های بیمارستانی دارند، ضروری به‌نظر می‌رسد.

**روش بررسی**

این مطالعه به‌صورت توصیفی بر روی ۲۷۶ ایزوله باکتریایی جمع‌آوری شده از بیمارستان‌های وابسته به دانشگاه علوم پزشکی کرمان انجام شد که شامل ۳۸ ایزوله کلبسیلا پنومونیه، ۱۶۹ ایزوله اشریشیاکلی و۶۹ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا تولید کننده بتالاکتاماز با مقاومت چندگانه بودند و از نمونه‌های سوختگی، خون، ادرار و سایر مایعات بدن جمع‌آوری شده بودند. برای بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی نمونه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم، ایمیپنم، سفتازیدیم، آموکسی‌سیلین، سفالوتین، سفتازیدیم، تتراسایکلین، جنتامایسین، نالیدیکسیک اسید، سیپروفلوکساسین و کوتریموکسازول (تهیه شده از شرکت HIMEDIA) از روش رقت در آگار استفاده شد و حداقل غلظتی از دارو که سبب ممانعت از رشد باکتری در محیط شد به‌عنوان حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی از رشد (MIC) در نظر گرفته شد (۶). تعیین تولید بتالاکتاماز وسیع‌الطیف

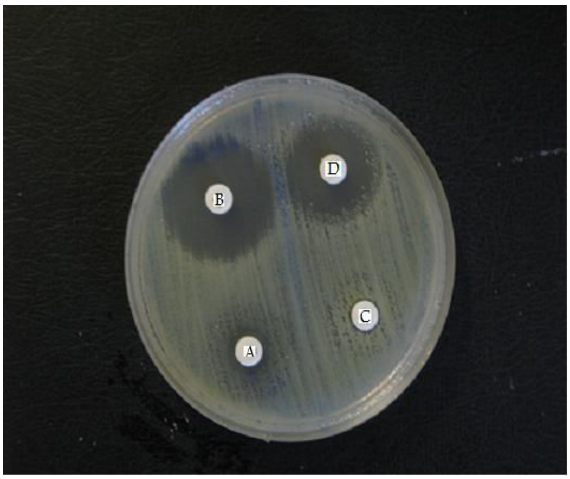
(ESBL) در این ایزوله‌ها به‌روش دیسک ترکیبی و با دو آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم (CTX) و سفوتاکسیم (CAZ) تهیه شده از شرکت HIMEDIA به‌تنهایی و همراه با اسیدکلاولانیک (CA) انجام گردید، که افزایش قطر هاله عدم رشد به اندازه ۵ mm ≤ در اطراف دیسک‌های حاوی اسیدکلاولانیک نشان‌دهنده حضور بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف بود (۷). از سویه‌های استاندارد *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ،*E.coli* ATCC 25922 و *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 به‌عنوان کنترل تست‌های آنتی‌بیوگرام و تولید ESBL استفاده شد (۸).

از دو روش برای تعیین فنوتیپ متالوبتالاکتاماز در ایزوله‌های مقاوم به ایمیپنم (IMP) استفاده گردید. در اولین روش از دیسک ایمیپنم به‌تنهایی و در مجاورت دیسک ایمیپنم که به آن ۱۰ µl محلول ۰/۵ مولار EDTA (SIGMA) اضافه شده بود استفاده شد و افزایش قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک ایمیپنم به همراه EDTA به‌اندازه ۷mm ≤ در مقابل دیسک ایمیپنم به‌تنهایی نشان‌دهنده حضور متالوبتالاکتامازها بود (۵،۹). در روش دوم از دیسک ایمیپنم (غلظت ۱۰ µg) به‌فاصله ۲cm از دیسک حاوی EDTA (۰/۵ مولار به مقدار ۱۰µl) استفاده شد که افزایش قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک حاوی EDTA نشان‌دهنده حضور متالوبتالاکتامازها بود (۱۰).

## نتایج

### تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی ایزوله‌ها (MIC) و تعیین تولید بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف

تمامی ۲۷۶ ایزوله مورد بررسی دارای مقاومت به بیش از سه آنتی‌بیوتیک از کلاس مختلف بودند. هم‌چنین وجود آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف (ESBL) با روش دیسک ترکیبی در تمامی ایزوله‌ها تأیید شد (شکل ۱).




**شکل ۱.** *کلبسیلا پنومونیه تولیدکننده بتالاکتاماز وسیع‌الطیف*

اسید کلاولانیک باعث مهار آنزیم‌های بتالاکتاماز و تشکیل هاله عدم رشد گردیده است

A= Cefotaxime, B= Cefotaxime + Clavulanic acid, C= Ceftazidime, D= Ceftazidime + Clavulanic acid

**شکل ۲.** *کلبسیلا پنومونیه تولیدکننده متالوبتالاکتاماز*

EDTA (اتیلن‌دی‌آمین ترا اسید استیک) باعث مهار آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز و تشکیل هاله عدم رشد در اطراف دیسک ایمیپنم و *EDTA* گردیده است

A= Imipenem, B= EDTA, C= Imipenem, D= Imipenem+EDTA

### مقاومت به ایمیپنم و حضور متالوبتالاکتامازها

از مجموع ۲۷۶ نمونه بالینی مورد بررسی ۳ ایزوله شامل دو ایزوله کلبسیلا پنومونیه جدا شده از کشت خون و یک ایزوله سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از ادرار که هر سه

از بیمارستان افضلی‌پور جدا شده بودند، به ایمیپنم مقاوم و MIC=32µg/ml را داشتند، که حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی از رشد آنها توسط برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها با حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی از رشد ($MIC_{50}$) ایزوله‌های حساس به ایمیپنم و تولیدکننده بتالاکتاماز در جدول شماره یک با یکدیگر مقایسه شده است. از بین سه ایزوله مقاوم به ایمیپنم، دو ایزوله شامل یک ایزوله کلبسیلا پنومونیه و یک ایزوله سودوموناس آئروژینوزا در هر دو روش از نظر وجود متالوبتالاکتاماز مثبت بودند ( شکل ۲).

هم‌چنین کلیه ایزوله‌های مقاوم به ایمیپنم تماماً نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین، نالیدیکسیک اسید و تتراسایکلین حساس بودند، در حالی که ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به ایمیپنم نسبت به جنتامایسین و کوتریموکسازول حساس بودند ولی ایزوله سودوموناس آئروژینوزای مقاوم به ایمیپنم به کوتریموکسازول و جنتامایسین مقاوم بود.

**جدول ۱.** *مقایسه حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد ایزوله های پسودوموناس آئروژینوزا و کلبسیلا پنومونیه مقاوم به ایمیپنم و مولد متالوبتالاکتاماز با ایزوله های حساس به ایمیپنم*

| باکتری‌های‌مورد بررسی(تعداد) | MIC*(µg/ml) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | متالوبتالاکتاماز | ایمیپنم | سفتازیدیم | سفوتاکسیم | سفتی زوکسیم | سفالکسین | آموکسی‌سیلین |
| سودوموناس آئروژینوزا (۱) | + | ۳۲ | ۶۴ | ۱۲۸ | ۲۵۶ | ۵۱۲ | ۲۵۶ |
| سودوموناس‌آئروژینوزا (۷۵) | _ | _ | ۸ | ۱۶ | ۱۶ | ۵۱۲ | ۵۱۲ |
| کلبسیلا پنومونیه (۱) | + | ۳۲ | ۶۴ | ۶۴ | ۱۲۸ | ۱۰۲۴ | ۱۰۲۴ |
| کلبسیلا پنومونیه (۱) | _ | ۳۲ | ۶۴ | ۶۴ | ۶۴ | ۱۰۲۴ | ۱۰۲۴ |
| کلبسیلا پنومونیه (۳۶) | _ | _ | ۱۲۸ | ۱۲۸ | ۳۲ | ۱۰۲۴ | ۱۰۲۴ |

* در مورد ایزوله های حساس $MIC_{50}$(حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی از رشد برای ۵۰٪ ایزوله‌ها) گزارش شده است

**بحث**

کاربا‌پنم‌ها مانند (ایمیپنم، مروپنم، بیاپنم، پانیپنم و ارتاپنم) کلاس مهمی از داروهای بتالاکتام می‌باشند که در برابر بتالاکتامازها مقاوم می‌باشند و در درمان عفونت‌های حاصل از باکتری‌هایی تولیدکننده ESBLs و AmpC که قادر به هیدرولیز پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها می‌باشند به‌کار می‌روند. بروز مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها در بین باکتری‌ها به‌ویژه باکتری‌های گرم منفی ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی در افراد مبتلا به نقص ایمنی، یک تهدید جدی در درمان عفونت‌های حاصل از آنها می‌باشد، به‌طوری که مطالعات اخیر نشان‌دهنده افزایش مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها به‌ویژه توسط متالوبتالاکتامازها می‌باشد.

در بررسی که توسط شکیبایی و همکاران در سال ۱۳۸۶ بر روی ۱۲۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا جداشده از بخش سوختگی بیمارستان شفا در شهر کرمان با روش E test انجام شد، هیچ ایزوله تولیدکننده متالوبتالاکتاماز گزارش نگردید (۱۱). اما در بررسی که توسط میهنی و همکاران بر روی ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بخش سوختگی بیمارستان طالقانی شهر اهواز انجام گردید، از بین ۱۰۰ نمونه بالینی جدا شده، ۴۲ نمونه دارای مقاومت به ایمیپنم بوده‌اند، که از میان آنها ۸ نمونه با روش E test دارای متالوبتالاکتاماز گزارش شده‌اند، که نتایج حاصل از PCR برای شناسایی ژن‌های تولید کننده در این ۸ نمونه با نتایج حاصل از E test به‌صورت ۱۰۰درصد هم‌خوانی داشته

است (۱۲). هم‌چنین در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۵ در فرانسه جهت تعیین فنوتیپ متالوبتالاکتاماز به‌روش دیسک ترکیبی مانند روش بررسی در این مطالعه انجام شد، ۴۶٪ ایزوله‌ها دارای این فنوتیپ بودند که بیشتر ایزوله‌های تولیدکننده متالوبتالاکتاماز از کشت خون جداسازی شده بودند. که بعد از انجام PCR برای شناسایی ژن‌های تولید کننده متالوبتالاکتاماز بر روی این ایزوله‌ها حدود ۱۰۰درصد هم‌خوانی با نتایج حاصل از روش فنوتیپی داشت که این بررسی نشان‌دهنده دقت در روش شناسایی فنوتیپ متالوبتالاکتاماز با روش دیسک ترکیبی است (۱۳). با توجه به‌مطالعه فوق روش دیسک ترکیبی که برای شناسایی متالوبتالاکتامازها در این بررسی مورد استفاده قرارگرفته از روش‌های مورد تأیید CLSI می‌باشد و با روش PCR و E test هم‌خوانی دارد. (۱۴).

تمامی گزارش‌ها مبنی بر افزایش ایزوله‌های مقاوم به کاربا‌پنم‌ها می‌باشند .در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۵ در کشور ژاپن صورت گرفت، نشان داده شد که بیماران عفونی شده با سودوموناس‌های آئروژینوزای تولیدکننده متالوبتالاکتاماز آنتی‌بیوتیک‌های مختلفی را برای درمان دریافت می‌کنند و مرگ‌ومیر ناشی از عفونت توسط این نوع باکتری‌ها بیشتر از انواع فاقد این آنزیم می‌باشد (۱۵). نکته‌ای که در اینجا مطرح می‌شود این است که آیا ایزوله‌های دارای متالوبتالاکتاماز فاکتورهای ویرولانس بیشتری در مقایسه با ایزوله‌های فاقد این آنزیم دارند؟ از آنجایی‌که ژن‌های تولیدکننده متالوبتالاکتاماز به‌صورت پلاسمیدی و کروموزومی می‌باشند، این امکان وجود دارد که تعداد سوش‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام گروه کاربا‌پنم‌ها در نتیجه انتقال پلاسمیدهای دارای ژن‌های کدکننده آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز در بین گونه‌های باکتریایی افزایش یابد، و شاید قادر به انتقال سایر ژن‌ها نظیر ژن‌های در ارتباط با سایرمقاومت‌ها و یا ویرولانس نیز باشند. در نتیجه با توجه به اهمیت این آنزیم‌ها لازم است تا تمامی آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی مجهز گشته و قادر باشند ایزوله‌های باکتریایی به‌ویژه باکتری‌های تولیدکننده بتالاکتاماز با طیف گسترده و متالوبتالاکتاماز را شناسایی نموده و آنها را از سایر مکانیسم‌های مقاومت تشخیص دهند، تا از شیوع هر چه بیشتر این گونه از باکتری‌های مقاوم جلوگیری گردد و در آینده مشکلات کمتری در درمان عفونت‌های حاصل از این باکتری‌ها ایجاد شود .

## سپاسگزاری

در پایان نویسندگان سپاس خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان به‌دلیل تأمین بودجه این طرح تحقیقاتی و هم‌چنین از خانم ثمانه عباسی برای همکاری در جمع‌آوری نمونه‌ها اعلام می‌دارند.

# Emergence of Imipenem Resistance and Presence of Metallo-β-Lactamases Enzymes in Multi Drug Resistant Gram Negative Bacilli Isolated from Clinical Samples in Kerman, 2007-2008

**Kalantar D., B.Sc.[1], Mansouri Sh., Ph. D.[2*], Razavi M., M.Sc.[3]**

1. M.Sc. Student of Microbiology, Afzalipour School of Medicine, Kerman University of Medical sciences, Kerman, Iran
2. Professor of Microbiology, Afzalipour School of Medicine, Kerman University of Medical sciences, Kerman, Iran
3. Master of Science in Microbiology

* Corresponding author, e-mail: smansouri@kmu.ac.ir

(Received: 31 August 2009 Accepted: 6 Jan. 2010)

## Abstract

**Background & Aims:** Imipenem is a member of Carbapenem with stability against most β-lactamases .It is of particular use in the treatment of infections associated with drug resistant gram negative bacteria harboring ESBL and AmpC genes. The aim of this study was to determine the imipenem resistance in gram negative bacteria causing nosocomial infections and the presence of metallo-*β*-lactamases ($MBL_S$) in resistant isolates.

**Methods:** Minimum inhibitory concentration (MIC) of imipenem was determined for 276 multiple drug resistant gram negative bacteria by agar dilution method. *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 were used as standard strains. Disk diffusion method with disks containing imipenem and imipenem+10µl EDTA (0.5 M) was used for determination of the presence of metallo-*β*-lactamases. Zone diameter ≥7mm of imipenem tested in combination with EDTA versus imipenem alone was considered as MBL positive.

**Results:** From a total of 276 β-lactamase producing isolates including *K. pneumoniae* (n=38), *E. coli* (n=169) and *P.aeruginosa* (n=69), 3 isolates with MIC=32µg/ml were found to be resistant to Imipenem. From these isolates, one strain of *K. pneumoniae* and one strain of *P.aeruginosa* isolates were determined to be MBL producers by phenotypic method.

**Conclusion:** According to the presence of metallo *β*- lactamases in bacterial strain in the region, resistance to this valuable therapeutic agent is not unexpected.

**Keywords:** Imipenem, metallo-*β*-lactamases, Gram- negative Bacteria, Drug Resistance

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2010; 17(3): 208-214

## References

1. Paterson DL. Resistance in Gram-negative Bacteria: Enterobacteriaceae. *Am J Med* 2006; 34(5): s20- s28.
2. Jacoby GA, Munoz-Price LS. The new β-lactamase. *N Engl J Med* 2005; 325(4): 380-91.
3. Poole K. Resistance to β-lactam antibiotics. CMLS, Cell. Mol. *Life Sci* 2004; 61: 2200–23.
4. Cornaglia G, Akova M, Amicosante G, Cant´on R, Cauda, R Docquier J, et al. Metallo-β- lactamases as emerging resistance determinants in gram-negative pathogens: open issues. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 29(4): 380-8.
5. Jesudason M. V, Kandathil A.J, Balaji V. Comparison of two methods to detect carbapenemase & metallo-β- lactamase production in clinical isolates. *Indian J Med Res* 2005; 121: 780-3.
6. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Laboratory methods for detection of antimicrobial resistance. In: Forbes BA,

Sham DF, weissfeld AS (editors) Bailey and Scotts Diagnostic Microbiology.12th ed., St louis, Mosb. Inc, 2007; pp 187-214.

7. Bradford PA. Extended-Spectrum β-Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14(4): 933–51.
8. Park YJ, Park S, Oh E, Park J, Lee K, Woo G, Lee K. Occurrence of Extended-Specterum β-lactamase among chromosomal AmpC-producing *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, and *Serratia marcescens* in korea and investigation of screening criteria. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 51(4): 265-9.
9. Chacko B, Varaiya A, Dedhia B. Imipenem resistant metallo β Lactamse producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Indian J Med Microbiol* 2008; 26(4): 398-407.
10. Papaparaskevas J, Pantazatou A, Stefanou I, Mela V, Galatidis N, Avlamis A. Differences in the evolution of imipenem susceptibility among *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates during a 6-year period in a tertiary care hospital. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 29(2): 197–200.
11. Shakibaie M R, Shahcheraghi F, Hashemi A, Adeli N.S. Detection of TEM, SHV and PER type Extended-Spectrum β-Lactamase Genes among Clinical Strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burnt patients at Shafa-Hospital, Kerman, Iran. *Iranian J Med Sci* 2008; 11(2): 49-54 [Persian].
12. Mihani F, Khosravi A. Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing metallo beta lactamases from infections in burned patients and identification of $bla_{IMP}$ and $bla_{VIM}$ genes by PCR. *Iranian J Med Microbiol* 2007; 1(1): 23-31 [Persian].
13. Pitout JDD, Gregson DB, Poirel L, McClure JA, Le P, Church DL. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo- beta- lactamases in large centralized laboratory. *J Clin Microbiol* 2005; 43(7): 3129-35.
14. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-Spectrum β-Lactamases: a clinical Update. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18(4): 657-86.
15. Hirakata Y, Yamaguchi T, Nakano M, Izumikawa K, Mine M, Aoki S, et al. Clinical and Bacteriological characteristics of IMP-type metallo-β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis* 2003; 37:26-32.