

Ứng dụng kỹ thuật multiplex PCR phát hiện các gen VEB, DIM và AmpC của các chủng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* phân lập tại Bệnh viện Xanh Pôn và Bệnh viện Thanh Nhàn

Ngô Thị Hồng Hạnh¹, Phạm Duy Thái¹, Trần Thị Vân Phương¹,
Hoàng Thị Hằng², Trần Huy Hoàng^{1*}

¹Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương

²Trường Đại học Kỹ thuật Y tế Hải Dương

Ngày nhận bài 30/5/2019; ngày gửi phản biện 3/6/2019; ngày nhận phản biện 9/7/2019; ngày chấp nhận đăng 15/7/2019

Tóm tắt:

Pseudomonas aeruginosa là một trong những căn nguyên phổ biến gây nhiễm trùng bệnh viện, nhiễm trùng cơ hội. Với các cơ chế đề kháng kháng sinh đa dạng như sinh β -lactamase phổ rộng, tăng cường sự biểu hiện của các gen mã hóa bơm đẩy, ức chế kênh porin, thay đổi tính thấm của màng..., *P. aeruginosa* đã gây ra rất nhiều khó khăn cho các bác sĩ lâm sàng trong việc lựa chọn phương pháp điều trị thích hợp. Trong nghiên cứu này, các tác giả sử dụng kỹ thuật multiplex PCR để phát hiện các gen mã hóa ESBL (blaVEB), MBL (blaDIM) và AmpC ở các chủng *P. aeruginosa* phân lập tại Bệnh viện Xanh Pôn và Bệnh viện Thanh Nhàn từ năm 2010 đến năm 2015. Trong tổng số 216 chủng nghiên cứu, kết quả cho thấy có 40 (18,51%) chủng mang gen blaVEB, 1 (0,46%) chủng mang gen blaDIM, 193 (89,35%) chủng mang gen AmpC. Trong số này, có 1 (0,46%) chủng mang đồng thời cả 2 gen DIM - AmpC và 38 (17,59%) chủng mang đồng thời cả 2 gen VEB - AmpC. Kết quả này đã nhấn mạnh sự đa dạng gen kháng kháng sinh của các chủng *P. aeruginosa* trong nghiên cứu cũng như chỉ ra tầm quan trọng của hoạt động kiểm soát nhiễm khuẩn tại bệnh viện để ngăn chặn sự lan truyền các tác nhân này và đem lại hiệu quả điều trị.

Từ khóa: AmpC, DIM, mPCR, *P. aeruginosa*, VEB.

Chỉ số phân loại: 3.5

Đặt vấn đề

Trực khuẩn mũ xanh (*Pseudomonas aeruginosa*) là một căn nguyên thường gặp trong nhiễm khuẩn bệnh viện, chiếm tỷ lệ khoảng 10% gây ra các bệnh viêm phổi, nhiễm trùng huyết, nhiễm trùng đường tiết niệu, nhiễm trùng vết mổ, ảnh hưởng đến sức khỏe của bệnh nhân cũng như gia tăng các gánh nặng về chi phí chăm sóc và điều trị [1-3]. Nhiều nghiên cứu đã được tiến hành trên thế giới cho thấy, các chủng *P. aeruginosa* đa kháng thuốc có rất nhiều cơ chế kháng đặc biệt như sản xuất các enzym β -lactamase, ức chế các gen porin hoặc tăng cường sự biểu hiện của các bơm đẩy kháng sinh efflux pump. Có nhiều chủng *P. aeruginosa* được phân lập có khả năng sản xuất enzym β -lactamase phổ rộng, trong đó có VEB-1 enzym (Vietnamese extended spectrum β -lactamase) được phát hiện lần đầu tiên ở *Escherichia coli* trên một bệnh nhân người Việt Nam vào năm 1996 nhưng sau đó phân lập được ở *P. aeruginosa* trên một bệnh nhân người Thái Lan [4, 5]. Ngoài ra, các chủng *P. aeruginosa* phân lập được có MBLs đã được báo cáo ở nhiều nơi trên

thế giới bao gồm: IMP, VIM, SPM, GIM và mới đây nhất là DIM (*Dutch imipenemase*). β -lactamase DIM-1 có khả năng thủy phân các cephalosporin phổ rộng, carbapenem, trước đây được báo cáo ở Hà Lan [6]. Nhiều nghiên cứu trên lâm sàng cũng cho thấy bệnh nhân nhiễm *P. aeruginosa* tăng sản xuất AmpC có tỷ lệ không đáp ứng thuốc cao hơn 67,5 lần các trường hợp nhiễm trùng *P. aeruginosa* không tăng sản xuất AmpC [7, 8]. Sự đa dạng trong cơ chế kháng và các loại gen đề kháng giúp *P. aeruginosa* trở thành một trong những căn nguyên gây bệnh nguy hiểm. Tuy nhiên, tại Việt Nam, các nghiên cứu về *P. aeruginosa* chủ yếu tập trung mô tả thực trạng kháng kháng sinh để đưa ra các cảnh báo cho bác sĩ điều trị, chưa có nhiều nghiên cứu xác định các gen liên quan đến kháng thuốc. Kỹ thuật PCR là kỹ thuật có độ nhạy và độ đặc hiệu cao được sử dụng để phát hiện các gen kháng kháng sinh ở *P. aeruginosa*. Trong nghiên cứu này, chúng tôi phát triển kỹ thuật multiplex PCR để phát hiện đồng thời các gen kháng kháng sinh VEB, DIM và AmpC trên các chủng *P. aeruginosa* phân lập tại 2 Bệnh viện: Xanh Pôn và Thanh Nhàn.

*Tác giả liên hệ: Email: thh@nihe.org.vn

Applying multiplex PCR to detect VEB, DIM and AmpC genes of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated at Saint Paul and Thanh Nhan Hospitals

Thi Hong Hanh Ngo¹, Duy Thai Pham¹,
Thi Van Phuong Tran¹, Thi Hang Hoang²,
Huy Hoang Tran^{1*}

¹National Institute of Hygiene and Epidemiology
²Hai Duong Medical Technical University

Received 30 May 2019; accepted 15 July 2019

Abstract:

Pseudomonas aeruginosa is one of the most common agents causing nosocomial infections, opportunistic infections. There are a variety of antibiotic resistance mechanisms in *P. aeruginosa* such as: extended spectrum beta-lactamase (ESBL) production, overexpression of efflux pump genes, inhibitions of porin channels, and changes in membrane permeability. *P. aeruginosa* has caused a lot of difficulties for clinicians in choosing appropriate treatment methods. In this study, we used multiplex PCR technique to detect ESBL (blaVEB), MBL (blaDIM) and AmpC coding genes in the strains of *P. aeruginosa* isolated at Saint Paul and Thanh Nhan Hospitals from 2010 to 2015. A total of 216 strains were studied, and the results showed that 40 (18.51%) strains had the blaVEB gene, 1 (0.46%) strain carried the blaDIM gene, 193 (89.35%) strains carried the AmpC gene. Out of them, 1 (0.46%) strain carried both the DIM and AmpC genes, and 38 (17.59%) strains simultaneously carried both VEB-AmpC genes. These results highlighted the antibiotic resistance gene diversity of *P. aeruginosa* strains in the study as well as pointed out the importance of infection control activities in hospitals to prevent the spread of these agents and achieve treatment effectiveness.

Keywords: AmpC, DIM, mPCR, *Pseudomonas aeruginosa*, VEB.

Classification number: 3.5

Phương pháp nghiên cứu

Chủng vi khuẩn

Nghiên cứu sử dụng 216 chủng *P. aeruginosa* được phân lập tại 2 Bệnh viện Xanh Pôn và Thanh Nhân trong giai đoạn 2010-2015. Các chủng được lưu trữ trong Ngân hàng chủng của Phòng thí nghiệm kháng sinh, Khoa Vi khuẩn, Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương.

Trước khi tiến hành nghiên cứu, các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường thạch Mueller - Hinton Agar (MHA) và sau đó được định danh lại bằng MALDI - TOF. Việc định danh lại các chủng vi khuẩn được thực hiện tại Đơn vị nghiên cứu lâm sàng Đại học Oxford - Hà Nội.

Địa điểm tiến hành nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện tại Phòng thí nghiệm kháng sinh, Khoa Vi khuẩn, Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương.

Kỹ thuật multiplex PCR (mPCR)

Tách chiết ADN: ADN khuôn được tách chiết bằng nhiệt: *P. aeruginosa* được xác định là chủng thuần và được nuôi cấy trên môi trường thạch dinh dưỡng MHA, ủ ở 37°C. Lấy 3-5 khuẩn lạc *P. aeruginosa*, hòa đều vào 200 µl nước cất vô trùng đựng trong ống eppendorf 1,5 ml. Ống hòa khuẩn được vortex đều và để ở nhiệt độ 95°C trong vòng 10 phút và loại bỏ cặn, thu nước nổi làm khuôn mẫu ADN cho phản ứng mPCR. ADN khuôn được lưu giữ ở -20°C cho đến khi thực hiện phản ứng mPCR.

Phản ứng PCR: các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu này đã được thiết kế trong nghiên cứu trước đó của Nadagopal Murugan [9] (bảng 1).

Bảng 1. Trình tự các cặp mồi sử dụng.

Nhóm thuốc	Mồi	Trình tự mồi 5'--3'	Nhiệt độ gắn mồi (°C)	Kích thước đoạn khuếch đại
Betalactamase	VEB F	CCCGATGCAAAGCGTTATGA	60	576
	VEB R	ACCCAACATCATTAGTGGC		
DIM	DIM F	TAACGACGAGGTACCTGAGC		410
	DIM R	ACCACACCACTACGTTGTCT		
AmpC	AmpC F	GATGAAGGCCAATGACATTCCG		742
	AmpC R	CATGTCGCCGACCTTGATGAA		

Thành phần của phản ứng mPCR bao gồm: 12,5 µl Go Taq Green Master Mix (Promega) đã bao gồm: 2X Green GoTaq® Reaction Buffer (pH 8,5), 400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 µM dCTP, 400 µM dTTP và 3 mM MgCl₂, 0,2 µl mồi ngược và mồi xuôi mỗi loại (10 µM), 1 µl ADN khuôn (1-10 ng/µl) và 10,3 µl nước Nuclease free. Tổng thể tích là 25 µl. Phản ứng được thực hiện trên máy luân nhiệt Thermo-cycler (Applied Biosystems, Veriti) theo chương trình:

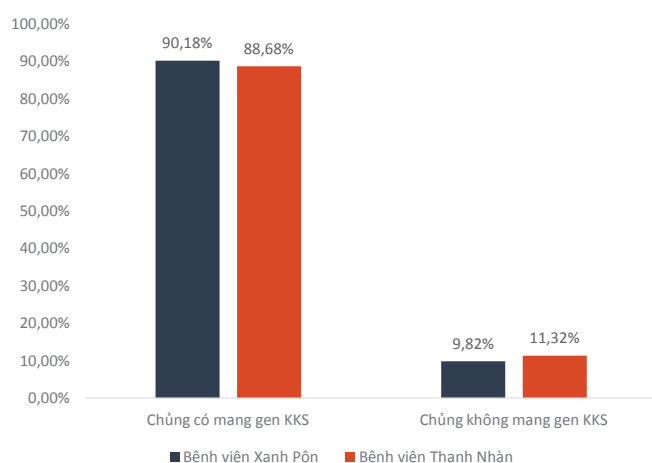
Giai đoạn khởi động 94°C trong 5 phút, giai đoạn biến tính ở 94°C/30 giây, gắn môi ở 60°C/30 giây, kéo dài ở 72°C/1,5 phút. Tổng số chu kỳ là 35. Giai đoạn kết thúc: 72°C/7 phút.

Điện di 10 µl sản phẩm phản ứng PCR trên thạch agarose 1,5% và nhuộm bằng Red safe. Quan sát và phân tích kết quả trên hệ thống máy chụp gel.

Phân tích và quản lý số liệu

Phần mềm excel được sử dụng để quản lý và phân tích số liệu.

Kết quả nghiên cứu



Biểu đồ 1. Tỷ lệ các chủng *P. aeruginosa* có mang gen kháng kháng sinh (KKS) được phát hiện tại Bệnh viện Xanh Pôn và Thanh Nhàn.

Biểu đồ 1 cho thấy tỷ lệ các chủng *P. aeruginosa* có mang gen kháng kháng sinh trong nghiên cứu này chiếm tỷ lệ rất cao, 90,18% tại Bệnh viện Xanh Pôn và 88,68% tại Bệnh viện Thanh Nhàn.

Bảng 2. Các chủng *P. aeruginosa* có mang gen kháng thuốc được phát hiện bằng kỹ thuật multiplex PCR.

	VEB		DIM		AmpC	
	Dương tính	Âm tính	Dương tính	Âm tính	Dương tính	Âm tính
Bệnh viện Xanh Pôn	32	131	1	162	146	17
Bệnh viện Thanh Nhàn	8	45	0	53	47	6
Tổng	40	176	1	215	193	23

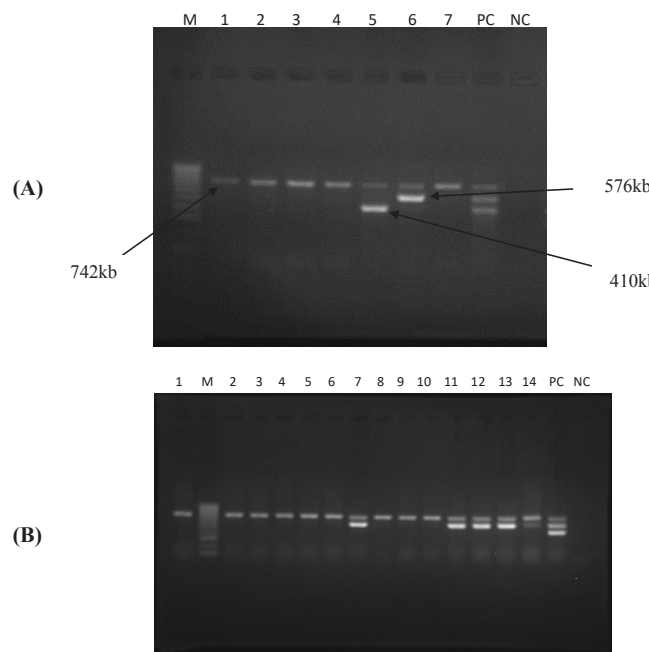
Kết quả multiplex PCR trên 216 chủng ở bảng 2 cho thấy, có 40 (18,51%) chủng có mang gen blaVEB, 1 (0,46%) chủng có mang gen blaDIM, 193 (89,35%) chủng có mang gen AmpC.

Trong số này, có 1 (0,46%) chủng mang đồng thời cả 2

gen DIM-AmpC và 38 (17,59%) chủng mang đồng thời cả 2 gen VEB-AmpC; không có chủng nào mang đồng thời cả 2 gen VEB-DIM hay cả 3 gen VEB-DIM-AmpC (bảng 3, hình 1).

Bảng 3. Các chủng *P. aeruginosa* mang 2-3 loại gen kháng thuốc.

	VEB-DIM	DIM-AmpC	VEB-AmpC	VEB-DIM-AmpC
Bệnh viện Xanh Pôn	0	1	31	0
Bệnh viện Thanh Nhàn	0	0	7	0
Tổng	0	1	38	0



Hình 1. Kết quả multiplex PCR khuếch đại các gen VEB-DIM-AmpC. Ladder 100 bp (Bioline-100 bp). (A) Các vị trí 1, 2, 3, 4, 7: AmpC dương tính; vị trí 6: AmpC và DIM dương tính; vị trí 7: AmpC và VEB dương tính; vị trí PC: chứng dương với cả 3 gen AmpC-VEB-DIM; vị trí NC: chứng âm. (B) Các vị trí 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10: AmpC dương tính; vị trí 7, 11, 12, 13, 14: AmpC và VEB dương tính; vị trí PC: chứng dương với cả 3 gen AmpC-VEB-DIM; vị trí NC: chứng âm.

Bàn luận

P. aeruginosa một trong những căn nguyên chính gây nhiễm trùng bệnh viện có tỷ lệ kháng thuốc tăng cao và ngày càng đa dạng. Do đó, vi khuẩn đã gây ra những khó khăn cho bác sĩ lâm sàng trong việc lựa chọn liệu pháp kháng sinh thích hợp để điều trị cho bệnh nhân. Trong nghiên cứu này, tỷ lệ các chủng *P. aeruginosa* có mang ít nhất 1 loại gen kháng thuốc trong 3 gen blaVEB, blaDIM và AmpC chiếm tỷ lệ rất cao, lần lượt là 90,18% tại Bệnh viện Xanh Pôn và 88,68% tại Bệnh viện Thanh Nhàn.

Giống như một số vi khuẩn Gram âm khác, *P. aeruginosa*

có chứa một gen gây cảm ứng thuốc nằm trên nhiễm sắc thể - blaAmpC, mã hóa một loại enzyme β -lactamase phổ rộng thuộc lớp C [2]. Enzyme này góp phần vào sức đề kháng tự nhiên của vi sinh vật đối với các phân tử không bền và gây cảm ứng, như aminopenicillins, cephalosporin thế hệ thứ nhất và thứ hai [3]. Quan trọng hơn, khi được sản xuất quá mức do đột biến làm thay đổi quá trình phục hồi peptidoglycan, AmpC trở thành nguyên nhân chính gây ra sự kháng thuốc đối với các penicillin antipseudomonal (ticarcillin và piperacillin), monobactams (aztreonam), cephalosporin thế hệ thứ tư (cefepime) [10, 11] và có khả năng chống lại tác dụng ức chế của clavulanate, sulbactam và tazobactam [12]. Trong nghiên cứu này, tỷ lệ các chủng *P. aeruginosa* có mang gen AmpC chiếm tỷ lệ rất cao (89,35%). Kết quả kháng sinh đồ cho thấy tỷ lệ các chủng kháng với cefepime là 85,24%. Như vậy, với sự xuất hiện của kiểu gen cùng những đặc điểm kiểu hình có thể nghi ngờ rằng các chủng trong nghiên cứu này có khả năng sản xuất AmpC ở mức cao. Để khẳng định chắc chắn cần thiết tiến hành nghiên cứu xác định mức độ biểu hiện gen AmpC hay khả năng sinh AmpC ở mức độ cao hoặc xác định các đột biến dẫn đến tăng sản xuất quá mức AmpC. Nhiều nghiên cứu trên thế giới đã được tiến hành và chỉ ra các đột biến được gọi là đột biến giải phóng phổ biến trong lâm sàng và chiếm tỷ lệ lớn ở các chủng kháng ceftazidime và cefepime trong các nghiên cứu khác nhau [8, 10-12]. Tình trạng đáng lo ngại này đã thúc đẩy sự phát triển của các loại β -lactam mới như ceftolozane và các chất ức chế AmpC mới như avibactam cho thấy các triển vọng trong công tác phòng chống loại đột biến này [13].

Bên cạnh đó, các chủng *P. aeruginosa* trong nghiên cứu này có mang gen blaVEB với tỷ lệ là 18,52%, thấp hơn nhiều so với nghiên cứu của Neil Woodford tại một bệnh viện ở Anh (2008-80%) nhưng cao hơn một chút so với nghiên cứu của Nandagopal Murugan tại Ấn Độ (2018-11,50%) và của Sahar Amirkamali tại Iran (2017-13,3%) [9, 13, 14]. Kết quả kháng sinh đồ tại Bệnh viện Xanh Pôn và Thanh Nhàn cho thấy, các chủng *P. aeruginosa* nêu trên có tỷ lệ đề kháng ceftazidime và cefepime cao (CAZ -72,68%, FEP-85,24%). Trong khi blaVEB được phát hiện khá phổ biến ở *P. aeruginosa* phân lập tại nhiều nước trên thế giới thì blaDIM là gen mới phát hiện trong giai đoạn hiện nay. Trên thế giới, các chủng mang gen blaDIM được báo cáo ở một vài trường hợp tại Hà Lan (1 trường hợp), Ấn Độ (5%), Sierra Leone (40%) [6, 9, 15] và trong nghiên cứu này chúng tôi đã phát hiện có một chủng mang gen blaDIM. Vi khuẩn có enzyme β -lactamase DIM-1 có khả năng ly giải cephalosporin phổ rộng và carbapenem [4, 6]. Các chủng *P. aeruginosa* trong nghiên cứu này có tỷ lệ kháng IMP và MEM rất cao, lần lượt là 97,63% và 95%. Do vậy, rất cần thiết phải tìm hiểu thêm về sự lan truyền và xuất hiện của

chủng vi khuẩn mang gen blaDIM tại Việt Nam.

Nghiên cứu cũng cho thấy một tỷ lệ không nhỏ (39/216-18,05%) chủng *P. aeruginosa* có đồng thời 2 loại gen kháng thuốc giúp làm tăng khả năng đề kháng kháng sinh, gây khó khăn rất lớn cho bác sĩ điều trị trong việc lựa chọn kháng sinh phù hợp. Điều này cũng cho thấy các chủng vi khuẩn mang gen kháng thuốc đang ngày càng đa dạng, một chủng vi khuẩn có thể mang một hoặc nhiều loại gen kháng thuốc khác nhau. Đây chính là hậu quả của việc lạm dụng kháng sinh trong điều trị nhiễm khuẩn - một tình trạng hiện đang rất phổ biến tại Việt Nam - sử dụng kháng sinh bừa bãi, không tuân thủ theo phác đồ điều trị, liều lượng kháng sinh sử dụng không đúng. Ngoài ra, khả năng lan truyền gen kháng kháng sinh trong cùng loài hoặc giữa 2 loài vi khuẩn thông qua plasmid, transposons và intergrons cũng giúp khả năng đề kháng của vi khuẩn đa dạng hơn. Do đó, tại các bệnh viện, việc thực hiện công tác kiểm soát nhiễm khuẩn là rất cần thiết để ngăn chặn sự lan truyền của các vi khuẩn kháng thuốc, từ đó có thể đưa ra phác đồ điều trị hiệu quả cho bệnh nhân.

Kết luận

Tỷ lệ các chủng *P. aeruginosa* có mang ít nhất 1 loại gen kháng thuốc trong 3 gen blaVEB, blaDIM và AmpC chiếm tỷ lệ rất cao, lần lượt là 90,18% tại Bệnh viện Xanh Pôn và 88,68% tại Bệnh viện Thanh Nhàn. Trong đó, 193/216 (89,35%) chủng *P. aeruginosa* mang gen AmpC, 40/216 (18,51%) mang gen VEB và 1/216 (0,46%) mang gen DIM.

Các chủng *P. aeruginosa* có sự đa dạng về kiểu gen kháng thuốc khi có 38/216 (17,59%) mang đồng thời cả 2 gen kháng kháng sinh, cho thấy khả năng đề kháng đa dạng của vi khuẩn này, từ đó có thể gây ra nhiều khó khăn cho bác sĩ lâm sàng trong việc lựa chọn phương pháp điều trị thích hợp.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này sử dụng kinh phí của đề tài cấp nhà nước mã số HNQT/SPĐP/02.16 và đề tài cấp cơ sở của Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương (theo Quyết định phê duyệt số 1782/QĐ-VSDTTU). Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] WHO (2014), *Antimicrobial resistance Global Report on Surveillance*.
- [2] Centers for Disease Control and Prevention (2016), *Antimicrobial Resistance/Biggest Threats*, https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest_threats.html.
- [3] K.M. Papp-Wallace, S. Bajaksouzian, A.M. Abdelhamed, et al. (2015), "Activities of ceftazidime, ceftazoline, and aztreonam alone and combined with avibactam against isogenic *Escherichia coli* strains expressing selected single beta-lactamases", *Diagn. Microbiol.*

Infect. Dis., **82(1)**, pp.65-69.

[4] T. Naas, L. Poirel, P. Nordmann (2008), “Minor extended-spectrum beta-lactamases”, *Clin. Microbiol. Infect.*, **14**, Suppl. 1, pp.42-52.

[5] T. Naas, L. Poirel, A. Karim, et al. (1999), “Molecular characterization of In50, a class 1 integron encoding the gene for the extended-spectrum beta-lactamase VEB-1 in *Pseudomonas aeruginosa*”, *FEMS Microbiol. Lett.*, **176(2)**, pp.411-419.

[6] L. Poirel, J.M. Rodriguez-Martinez, N. Al Naiemi, et al. (2010), “Characterization of DIM-1, an integron-encoded metallo-beta-lactamase from a *Pseudomonas stutzeri* clinical isolate in the Netherlands”, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **54(6)**, pp.2420-2424.

[7] V.H. Tam, K.T. Chang, A.N. Schilling, et al. (2009), “Impact of AmpC overexpression on outcomes of patients with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia”, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **63(3)**, pp.279-285.

[8] P.D. Lister, D.J. Wolter, N.D. Hanson (2009), “Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms”, *Clin. Microbiol. Rev.*, **22(4)**, pp.582-610.

[9] N. Murugan, J. Malathi, K.L. Therese, et al. (2018), “Application of six multiplex PCR’s among 200 clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* for the detection of 20 drug resistance encoding genes”, *Kaohsiung J. Med. Sci.*, **34(2)**, pp.79-88.

[10] J.M. Rodriguez-Martinez, L. Poirel, P. Nordmann (2009), “Extended-spectrum cephalosporinases in *Pseudomonas aeruginosa*”, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **53(5)**, pp.1766-1771.

[11] G.A. Jacoby (2009), “AmpC beta-lactamases”, *Clin. Microbiol. Rev.*, **22(1)**, pp.161-182.

[12] M. Berrazeg, K. Jeannot, V.Y. Ntsogo Enguene, et al. (2015), “Mutations in beta-Lactamase AmpC increase resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates to antipseudomonal cephalosporins”, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **59(10)**, pp.6248-6255.

[13] N. Woodford, J. Zhang, M.E. Kaufmann, et al. (2008), “Detection of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing VEB-type extended-spectrum beta-lactamases in the United Kingdom”, *J. Antimicrob. Chemother.*, **62(6)**, pp.1265-1268.

[14] S. Amirkamali, T. Naserpour-Farivar, K. Azarhoosh, Amir Peymani (2017), “Distribution of the blaOXA and resistance patterns of ESBL-producing, blaVEB-1, and blaGES-1 *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitals in Tehran and Qazvin, Iran”, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, **50(3)**, pp.315-320.

[15] T.A. Leski, U. Bangura, D.H. Jimmy, et al. (2013), “Identification of blaOXA-(5)(1)-like, blaOXA-(5)(8), blaDIM-(1), and blaVIM carbapenemase genes in hospital *Enterobacteriaceae* isolates from Sierra Leone”, *J. Clin. Microbiol.*, **51(7)**, pp.2435-2438.