جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله میکروب شناسی پزشکی ایران
سال ۱ شماره ۴ زمستان ۱۳۸۶، صفحات ۲۱-۲۷

بررسی مولکولی بتالاکتامازهای PER، VEB، SHV و TEM در سویه‌های *پسودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از نمونه های زخم در دو بیمارستان تهران به روش PCR

فرشته شاهچراغی*، وجیهه سادات نیک بین، فهیمه شورج

بخش باکتری شناسی، انستیتو پاستور ایران
نویسنده رابط: فرشته شاهچراغی، بخش باکتری شناسی، انستیتو پاستور ایران
تلفن: ۶۶۴۰۵۵۳۵ feresh100@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۸۶/۱۰/۲۲ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۶/۱۲/۱۵

چکیده:

زمینه و اهداف: بتالاکتامازهای کلاس A از جمله SHV، TEM، PER و VEB از مهمترین عوامل ایجاد مقاومت در باکتری های گرم منفی از جمله *Pseudomonas aeruginosa* به حساب می‌آیند. آنزیم PER وVEB به دلیل فعالیت بتالاکتامازی وسیع‌الطیف (ESBL) و ایجاد مقاومت بالا نسبت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام در این باکتری اهمیت کلینیکی قابل توجهی داشته و تاکنون مطالعه ای در ارتباط با وجود و چگونگی این آنزیم ها در ایران انجام نشده است. لذا در این تحقیق فراوانی ژن های بتالاکتاماز PER ، VEB ، SHV وTEM در سویه‌های *P. aeruginosa* جدا شده از عفونت های زخم در دو بیمارستان تهران مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: تعداد ۱۰۰ سویه باکتری پسودوموناس آئروژینوزا از نمونه های زخم از دو بیمارستان دانشگاهی در تهران در طی یک سال جمع آوری شدند. حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های ایزوله شده به روش انتشار در آگار (Kirby-Bauer) نسبت به آنتی‌بیوتیک های سفتیزوکسیم، آمیکاسین، جنتامیسین، سیپروفلوکساسین، پیپراسیلین، پیپراسیلین-تازوباکتام، سفترياکسون، سفوتاکسیم، سفتازیدیم و ایمی‌پنم تعیین گردید. سپس MIC این سویه‌ها نسبت به سفتازیدیم و ایمی‌پنم به روش (CLSI) Microbroth dilution بررسی شد. سویه‌های دارای $MIC_{CAZ}\geq16$ µg/ml جهت PCR ژن های بتالاکتاماز SHV، TEM، PER و VEB مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: از ۱۰۰ سویه مورد بررسی ۶ سویه دارای $MIC_{IMP}\geq4$ بودند. نتایج آنتی‌بیوگرام نشان داد که ۴۲٪ از سویه‌ها به سفتازیدیم مقاوم بوده و ۴۶٪ از سویه‌ها دارای $MIC_{CAZ}\geq16$ بودند. با توجه به آزمون PCR از میان ۴۶ سویه دارای $MIC_{CAZ}\geq16$ به ترتیب ۲۸٪، ۱۱٪، ۱۳٪ و ۱۱٪ دارای ژن های بتالاکتاماز SHV، TEM، PER و VEB بودند.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج این بررسی ایمی‌پنم مؤثرترین دارو برعلیه سویه های *P. aeruginosa* جدا شده ازعفونت های زخم می‌باشد. از میان ۴ ژن بتالاکتاماز مورد بررسی بیشترین میزان مربوط به SHV بوده و فراوانی ژن بتالاکتاماز PER و VEB نیز قابل توجه می باشد. لازم به ذکر است که این نتایج برای اولین بار در ایران گزارش می شود.

کلید واژه ها: بتالاکتاماز ، SHV، TEM، PER و VEB، *P. aeruginosa*

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه:

با مصرف کلینیکی آنتی بیوتیک ها سویه‌های *Pseudomonas aeruginosa* بیمارستانی دارای مقاومت چندگانه نسبت به آنتی‌بیوتیک ها (MDR) در سراسر جهان به طور فزاینده‌ای انتشار یافته است (۱). نفوذپذیری کم پروتئین های غشای خارجی (OMPs)، تولید بتالاکتاماز AmpC کروموزومی و تغییر در سیستم های تراوشی (efflux pumps) از عوامل اصلی مقاومت ذاتی این باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک هاست (۲). یکی از راه های ایجاد مقاومت *P. aeruginosa* نسبت به بتالاکتام ها تولید آنزیم بتالاکتاماز می‌باشد که معضلات بسیاری را در درمان عفونت های ناشی از این باکتری ایجاد کرده است. متأسفانه مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک ها به دلیل وجود مکانیزم های ذاتی مقاومت مانند AmpC و اکتساب ژن های آنزیم بتالاکتامازی در *P. aeruginosa* روز به روز در حال افزایش است (۲و۳).

بتالاکتامازها در *P. aeruginosa* بر اساس طیف اثر بر آنتی‌بیوتیک ها به سه دسته تقسیم بندی شده‌اند: بتالاکتامازهای با طیف اثر محدود که باعث هیدرولیز پنی‌سیلین ها و سفوپرازون می‌شوند. بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) که باعث هیدرولیز مونوباکتام ها و سفمها می‌گردند و متالوبتالاکتامازها که بر تمامی بتالاکتام های آنتی سودوموناسی به جز مونوباکتام ها مؤثرند (۲و۳). بتالاکتامازها طبق تقسیم بندی Ambler به چهار دسته A تا D تقسیم می شوند که نوع A، C و D سرین بتالاکتاماز هستند در حالیکه نوع B متالوبتالاکتاماز است. ESBL ها از بتالاکتامازهای کلاس A هستند که توانایی هیدرولیز سفالوسپورین های نسل سوم و مونوباکتام ها را دارند اما قادر به هیدرولیز کربپنم ها نمی باشند. بیشتر این آنزیم ها مشتقات بتالاکتامازهای SHV و TEM با یک یا چند تغییردراسیدهای آمینه آنها می باشند که آنزیم TEM-1 و مشتقات آن بیشتر درانتروباکتریاسه و بتالاکتامازهای مشتق از SHV بیشتر در *K. pneumoniea* گزارش شده اند: در حالیکه آنزیم های ESBL نوع PER و VEB علاوه بر انتروباکتریاسه در *P. aeruginosa* نیز با فراوانی بیشتری یافت شده اند (۷-۴).

بتالاکتاماز PER-1 برای اولین بار در سال ۱۹۹۱ دریک بیمار ترکیه ای بستری دریکی از بیمارستان های فرانسه گزارش شد. آنزیم PER-1 تنها در۲۰-۱۸٪ اسیدهای آمینه با TEM و SHV شباهت داشته و قادر به هیدرولیز پنی سیلین ها و سفالوسپورین هاست و فعالیت آن توسط کلاوولانیک اسید نیز بازداشته می شود (۸ و۹). این آنزیم به دلیل فعالیت ESBL زیادی که بر بتالاکتام های ضد سودوموناسی دارد، اهمیت کلینیکی قابل توجهی داشته و در اروپا و آسیا انتشار یافته است (۷و۸ و۱۰و۱۱و۱۲). با اینکه این آنزیم بیشتر در ترکیه شایع است در فرانسه، ایتالیا و بلژیک هم انتشاریافته است (۱۳). اخیرا در ایتالیا سویه *P. aeruginosa* مولد PER-1 یافت شده است که دارای ژن VIM-2 که یک کربپنماز است نیز می باشد که در نتیجه این ارگانیسم به کلیه آنتی بیوتیک ها مقاوم است (۱۴). آنزیم PER-1 هم بر کروموزوم باکتری و هم برروی پلازمید یافت شده است . با توجه به اینکه این آنزیم در باکتری های مختلفی گزارش شده است لذا ژن این آنزیم برروی عناصر قابل انتقال واقع شده است (۱۵). بتالاکتاماز VEB-1 نیز در۳۸٪ توالی اسیدهای آمینه با PER شباهت دارد. این آنزیم عامل مقاومت بالا نسبت به سفتازیدیم، سفوتاکسیم و آزترونام است و با اینکه برای اولین بار در یک نوزاد ویتنامی در فرانسه روی پلازمید و اینتگرون انتروباکتریاسه گزارش شد اما شیوع و فراوانی آن در*P. aeruginosa* بیشتر است. این آنزیم در تایلند، کویت و چین و هند نیز گزارش شده و به نظر می رسد که منشأ آن از جنوب آسیا است (۱۳و۱۶و۱۷).

با توجه به اهمیت *P. aeruginosa* در ایجاد عفونت های زخمی در بیماران بستری در بیمارستان و اهمیت بتالاکتامازها در ایجاد مقاومت به آنتی بیوتیک ها در این باکتری و نیز انتشار ژن های این آنزیم ها در کشورهای همسایه مانند ترکیه و با توجه به اینکه تاکنون مطالعه ای دراین زمینه در ایران صورت نگرفته است، فراوانی ژن های بتالاکتاماز نوع TEM VEB, PER و SHV با استفاده از آزمون PCR در سویه های *P. aeruginosa* مقاوم جدا شده از نمونه های زخم از دو بیمارستان تهران مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها:

به مدت یک سال (۱۳۸۴-۱۳۸۵) ۵۸۰ سویه *P. aeruginosa* از نمونه‌های مختلف بالینی از جمله ادرار، خون، خلط، زخم، ترشحات لوله تراشه، چشم، گوش و سایر موارد از بیمارستان امام خمینی تهران (۲۴۳ نمونه) و مرکز طبی کودکان (۳۳۷ نمونه) جمع‌آوری شده که از این تعداد ۱۰۰ نمونه (۹۱ نمونه از بیمارستان امام خمینی و ۹ نمونه از مرکز طبی کودکان) مربوط به عفونت های زخم بود. پس از انجام تست های بیوشیمیایی، مقاومت سویه‌های *P. aeruginosa* جدا شده از زخم نسبت به آنتی‌بیوتیک های سفتیزوکسیم (ZOX)، آمیکاسین (AN)، جنتامیسین (GM)، سیپروفلوکساسین (CIP)،

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

پیپراسیلین (PC)، پیپراسیلین-تازوباکتام (Pt)، سفتریاکسون (CRO)، سفوتاکسیم (CTX)، سفتازیدیم (CAZ) و ایمی‌پنم (IMP) (تهیه شده از شرکت BBL) به روش انتشار در آگار (Kirby-Bauer) و سپس MIC سویه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک های سفتازیدیم و ایمی‌پنم با استفاده از روش Microbroth dilution با توجه به پروتوکل CLSI تعیین گردید. از سویه *P. aeruginosa* ATCC 27853 جهت کنترل روش های آنتی‌بیوگرام و MIC استفاده شد. DNA سویه‌های دارای MIC≥16μg/ml نسبت به سفتازیدیم به روش فنل-کلروفورم جهت آزمون PCR استخراج شد؛ بدین صورت که سوسپانسیون باکتری در بافر لیز حاوی SDS و آنزیم پروتئیناز K در دمای ۵۶°C انکوبه و پروتئین های آن با مخلوط فنل-کلروفورم-ایزوآمیل الکل حذف گردید. سپس DNA باکتری با اتانول سرد رسوب داده شده و در بافر TE حاوی RNase حل شد. آزمون PCR نیز جهت بررسی فراوانی ژن های بتالاکتاماز VEB , PER, TEM و SHV با استفاده از پرایمرها و دماهای ذکر شده در جدول ۱ انجام گردید (۷). ۰/۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده به PCR Master mix با حجم نهایی ۲۵ µl (هر ویال محتوی ۰/۸ میلی مول $Mgcl_2$ و ۰/۲ میلی مول dNTPs و ۵ پیکومول از هر پرایمر و یک واحد آنزیم Taq polymerase) اضافه گردید. از سویه *K. pneumonie* 7881 مولد TEM و SHV و سویه *P. aeruginosa KOAS* مولد PER-1 و سویه *P. aeruginosa 10.2* مولد VEB-1 (تهیه شده از پروفسور نوردمن، فرانسه) جهت کنترل در آزمون PCR استفاده گردید. از مارکر 100bp ladder (Fermentase) جهت تأیید وزن مولکولی محصولات تکثیر شده استفاده شد. الکتروفورز نمونه ها در ژل ۱٪ آگارز انجام شده و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید نتایج با UV مشاهده شد.

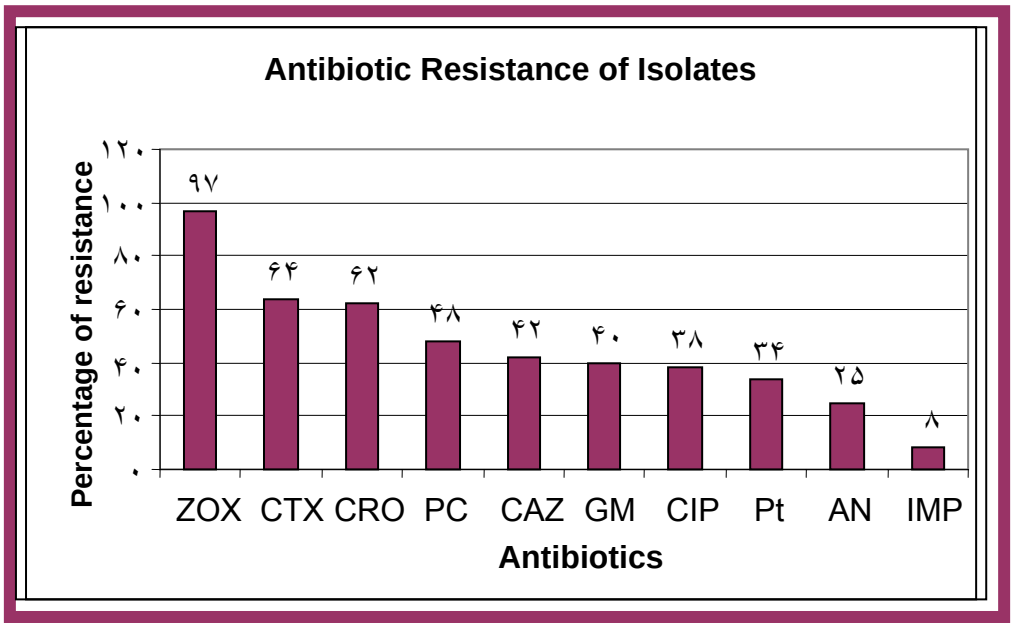
یافته ها:

با توجه به نتایج به دست آمده در این بررسی بیشترین میزان مقاومت مربوط به آنتی بیوتیک سفتیزوکسیم و کمترین میزان مربوط به ایمی‌پنم بود (نمودار۱). در رابطه با ایمی پنم تنها ۶٪ از ۱۰۰ سویه مورد بررسی MIC≥4μg/ml نشان دادند. میزان مقاومت به سفتازیدیم ۴۲٪ مشاهده شد که برای سویه های دارای قطر هاله مساوی و کمتر از ۲۰ میلیمترکه نمونه های حساس و حدواسط را نیز در بر می گیرد، MIC سفتازیدیم تعیین شد و نتایج نشان داد که ۴۶٪ از سویه ها دارای MIC≥۱۶ µg/ml (۲ نمونه از مرکز طبی کودکان و ۴۴ نمونه از بیمارستان امام خمینی تهران) بودند که بیانگر تفاوت این دو روش تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی است. محصول PCR این سویه ها برای ژن های بتالاکتاماز VEB, PER, TEM و SHV در ژل آگارز به ترتیب قطعه ای به طول ۸۶۱، ۹۲۵، ۶۴۳ و ۲۳۱ جفت باز بود (شکل۱). از بین ۴۶سویه دارای MIC≥16μg/ml نسبت به سفتازیدیم نیز۶ (۱۳٪) ، ۵ (۱۱٪) ، ۵ (۱۱٪) و۱۳ (۲۸٪) سویه در آزمون PCR به ترتیب حاوی ژن های VEB, PER TEM و SHV بودند که همه آنها نیز MIC≥۶۴ µg/ml داشتند. چهار نمونه که دارای µg/ml MIC≥۲۵۶ نسبت به سفتازیدیم بودند در PCR برای دو ژن همزمان مثبت شدند و یک نمونه نیز با MIC=۶۴ µg/ml دارای هر ۴ ژن بود. در نمونه های جدا شده از مرکز طبی کودکان هیچکدام از ژن های مورد مطالعه مشاهده نشد.

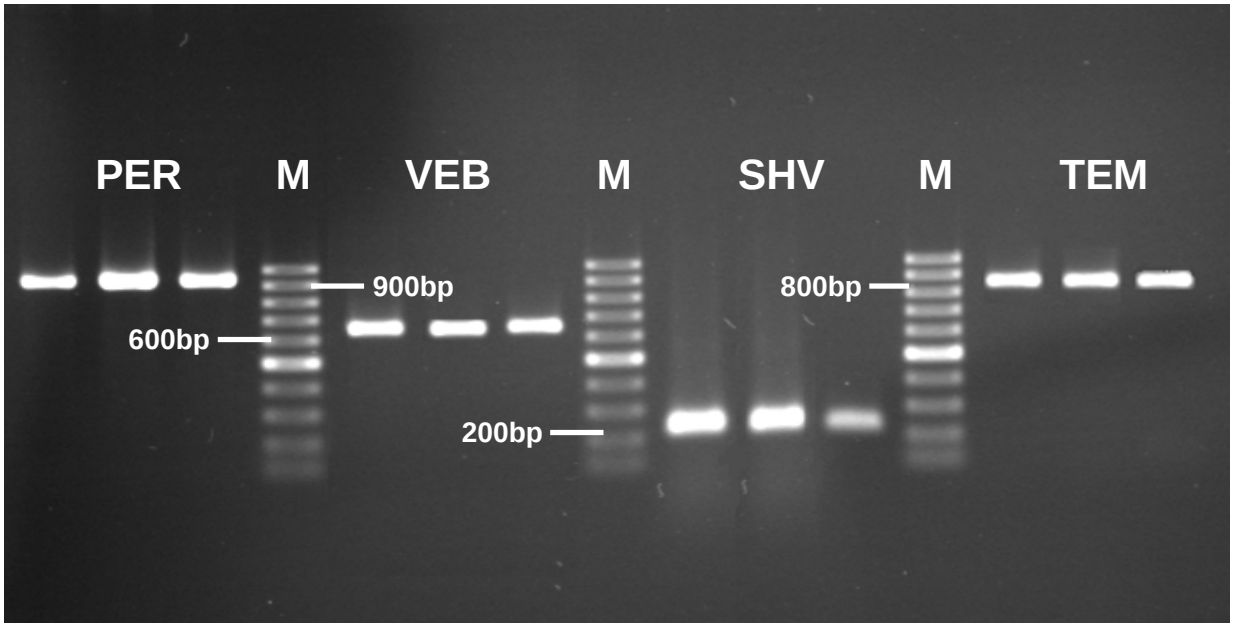
جدول ۱: توالی پرایمرها و دماهای مورد استفاده در آزمون PCR ژن های bla_{PER}، bla_{VEB}، bla_{SHV} و bla_{TEM}

Primers	Sequence (5´ to 3´)	PCR			Cycles	Gene
		Denaturation	Annealing	Extension		
VEB-1A	CGACTTCCATTTCCCGATGC	۹۵°C ۱ min	۵۵°C ۱ min	۷۲°C ۱ min	۳۰	bla_{VEB} ۶۴۳bp
VEB-1B	GGACTCTGCAACAAATACGC					
PER-A	ATGAATGTCATTATAAAAGC	۹۴°C ۳۰ s	۴۳°C ۱ min	۷۲°C ۱ min	۳۵	bla_{PER} ۹۲۵bp
PER-B	AATTTGGGCTTAGGGCAGAA					
TEM-A	GAGTATTCAACATTTCCGTGTC	۹۴°C ۳۰s	۴۵°C ۱ min	۷۲°C ۱ min	۳۰	bla_{TEM} ۸۶۱bp
TEM-B	TAATCAGTGAGGCACCTATCTC					
SWSHVA	AAGATCCACTATCGCCAGCAG	۹۴°C ۳۰ s	۶۰°C ۱ min	۷۲°C ۱ min	۳۰	bla_{SHV} ۲۳۱bp
SWSHV-B	ATTCAGTTCCGTTTCCCAGCGG					

نمودار ۱: مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های *P. aeruginosa* مورد بررسی در این مطالعه



شکل ۱: الکتروفورزمحصول PCR ژن های مورد بررسی بر روی ژل آگارز (۱٪)



بحث:

با توجه به اهمیت *P. aeruginosa* در عفونت های بیمارستانی بررسی حضور و تعیین مقاومت این باکتری در سویه های جدا شده از زخم نشان داد که مقاومت در این سویه ها بالاست بطوریکه مقاومت نسبت به سفتازیدیم و سیپروفلوکساسین و ایمی‌پنم در کل سویه ها به ترتیب ۲۴٪، ۱۹٪ و ۵٪ بوده در حالیکه در نمونه های زخم ۴۲٪، ۳۷٪ و ۸٪ تعیین شد. به دلیل اینکه ایمی‌پنم در کشور ما یک آنتی بیوتیک بیمارستانی بوده و بدون تجویز پزشک مصرف نمی شود لذا مقاومت به این دارو خوشبختانه در ایران نسبت به سایر کشورها از قبیل ترکیه، کانادا و ایتالیا (۲۰-۱۸) پایین تر است. همچنین مقاومت در سویه های جدا شده از کودکان با توجه به سن کم آنها ودر نتیجه مصرف کمتر آنتی بیوتیک در آنها کمتر می باشد.

تشخیص فنوتیپی ESBL ها توسط کلاوولانیک اسید در *P. aeruginosa* به دلایل مختلف از قبیل وجود AmpC کروموزومی و یا آنزیم های القایی متالوآنزیم ها یا اکساسیلیناز وسیع الطیف و مقاومت نسبت به کلاوولانات و مکانیزم های دیگر مقاومت مثل نفوذپذیری کم غشا و وجود پمپ های تراوشی efflux pumps نسبت به انتروباکتریاسه مشکلتر بوده و باعث نتایج کاذب می گردد (۷). لذا انجام تکنیک های مولکولی از قبیل PCR جهت تشخیص انواع ESBL لازم به نظر می رسد.

در مطالعات انجام شده در سال های گذشته فراوانی آنزیم SHV در *P. aeruginosa* کم بوده (۱و۲۱) و TEM نیز درسویه های محدودی از این باکتری درفرانسه گزارش شده است (۲۲) درحالیکه در انتروباکتریاسه به فراوانی دیده می شود (۲۳). به نظر می رسد که این آنزیم ها از انتروباکتریاسه به *P. aeruginosa* توسط عناصر متحرک انتقال یافته اند (۲۴). بتالاکتامازهای PER و VEB در *P. aeruginosa* بیشترکروموزومی هستند. بتالاکتاماز نوع PER شباهت آمینواسیدی کمی با SHV و TEM داشته و برای اولین بار نیز در *P. aeruginosa* گزارش شده و بطور کامل در این باکتری شناسایی شده است (۸ و۹). در مطالعه ای که در لهستان انجام شده نیز این آنزیم در تمام سویه های مولد ESBL مشاهده شده است (۲۵). فراوانی این آنزیم در این مطالعه نسبت به مطالعات انجام گرفته در سایر کشورها از قبیل ترکیه و بلژیک و ایتالیا کمتر است (۲۸۲۶و۲۷). اما نسبت به ژاپن ، کره وبلغارستان بیشتر است (۳۱-۲۹). فراوانی VEB نیز دراین مطالعه نسبت به کشورهایی مثل تایلند، بلغارستان کمتر می باشد و شیوع این آنزیم در جنوب آسیا مشاهده شده است (۱۳و۳۰و۳۲). با این وجود بر خلاف سایر کشورها فراوانی بتالاکتاماز SHV درسویه های زخم مورد بررسی دراین مطالعه از انواع دیگر بیشتر بود.

واقع بودن بعضی از بتالاکتامازهای وسیع الطیف روی ترنسپوزون ها و احتمال حرکت آنها بر روی ژنوم ممکن است باعث بیان همزمان ژن های مقاومت و در نتیجه ظهور ژن های جدید مقاومت به آنتی بیوتیک های دیگری از سفالوسپورین های وسیع الطیف (مانند ژن GES-2) و حتی کرباپنم ها شود (۷). بنابراین نه تنها در مصرف سفالوسپورین های وسیع الطیف بلکه در رابطه با آنتی بیوتیک های غیر بتالاکتامی نیز باید سیاست های مناسب درمانی اتخاذ شود.

انجام آزمون PCR بدون تعیین سکانس نوکلئوتیدی (sequencing) قادر به تمایز بین آنزیم های TEM وSHV نوع ESBL و non-ESBL در *P. aeruginosa* نیست، لذا آنالیز سکانس نوکلئوتیدی روش قابل اعتمادی جهت شناسایی ژن های ESBL یک گروه ژنی می باشد. علاوه بر این می توان از روش هایی چون PCR-RFLP و PFGE جهت تایپینگ ژن ها و سویه ها استفاده کرد .همچنین می توان با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ساب تایپ های ژن های مورد بررسی را تعیین نمود.

نتیجه گیری:

با توجه به اینکه اکثریت سویه های مقاوم به بتالاکتام ها در ایران نسبت به ایمی پنم حساس می‌باشند برای درمان عفونت های بیمارستانی ناشی از این سویه‌ها استفاده از یک کرباپنم همراه با یک آنتی‌بیوتیک غیربتالاکتامی یا جهت جلوگیری از انتشار سویه‌های مقاوم به این آنتی‌بیوتیک ها از یک بتالاکتام در ترکیب با یک بازدارنده بتالاکتاماز پیشنهاد می گردد. بطوریکه در گزارشات قبلی با جایگزینی سفتازیدیم با پیپراسیلین-تازوباکتام فراوانی ESBL ها کاهش یافته است (۳۳). اما جهت جلوگیری از شیوع سویه‌های مقاوم به داروهای جدید همواره مصرف آنها باید کنترل شود و سویه‌های تحت درمان دائما مورد بررسی قرار گیرند.

فهرست مراجع:

1. Chanawong A, M'zali FH, Heritage J, Lulitanond A, Hawkey PM. SHV-12, SHV-5, SHV-2a and VEB-1 extended-spectrum β-lactamases in Gram-negative bacteria isolated in a university hospital in Thailand. *J Antimicrob Chemother* 2001; **48**:839-852.
2. Rossolini GM, Mantegoli E. Treatment and control of severe infections caused by multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect* 2005; **11:**17-32.
3. Navon-Venezia S, Ben-Ami R, Carmeli Y. Update on *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infections in the healthcare setting**.** *Curr Opin Infect Dis* 2005; **18:**306-313.
4. Howard C, Daal A, Kelly G, Schooneveldt J, Nimmo G, Giffard1 PM. Identification and minisequencing-based discrimination of SHV

β-Lactamases in nosocomial infection-associated *Klebsiella pneumoniae* in Brisbane, Australia *Antimicrob Agents and Chemother* 2002; **46**:659–664

5. Bonnet, R.Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48:**1–14.
6. Bradford, PA**.** Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; **14:**933–951.
7. Weldhagen, GF, Poirel L, Nordmann P. Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother Minirev* 2003; **47:**2385–2392.
8. Nordmann, P, Ronco E, Naas T, Duport C, Michel-Briand Y, Labia R. Characterization of a novel extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; **37**:962–969.
9. Nordman P, Naas T. Sequence analysis of PER-1 extended spectrum β-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with class A β-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; **38**:104-114
10. Pagani L, Mantengoli E, Migliavacca R, Nucleo E, Pollini S, Spalla M, *et al*. Multifocal detection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing the PER-1 extended spectrum beta-lactamase in northern Italy. *J Clin Microbiol* 2004; **42**:2523–2529.
11. Yong DJ, Shin H, Kim S, Lim Y, Yum JH, Lee K, *et al*. High prevalence of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Acinetobacter* spp. In Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**:1749–1751.
12. Bouthors AT, Dagoneau-Blanchard N, Naas T, Nordmann P, Jarlier V, Sougakoff W. Role of residues 104, 164, 166, 238 and 240 in the substrate profile of PER-1 beta-lactamase hydrolyzing third-generation cephalosporins. *Biochem J* 1998; **15**:1443–1449.
13. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-Spectrum β-Lactamases: a Clinical Update. *Clin Microbiol* Rev 2005; **18**(4):657–686.
14. Docquier JD, Luzzaro F, Amicosante G, Toniolo A, Rossolini. GM. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing PER-1 extended-spectrum serine-beta-lactamase and VIM-2 metallo-beta-lactamase. *Emerg Infect Dis* 2001; **7:**910–911.
15. Mantengoli E, Rossolini GM. Tn*5393*d, A complex Tn*5393* derivative carrying the PER-1 extended-spectrum β-lactamase gene and other resistance determinants *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 3289–3296.
16. Poirel L, Naas T, Guibert M, Chaibi EB, Labia R, Nordmann P. Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; **43**:573–581.
17. Aubert D, Girlich D, Naas T, Nagarajan S, Nordmann P. Functional and structural characterization of the genetic environment of an extended-spectrum β-lactamase bla_{VEB} gene from a *Pseudomonas aeruginosa* isolate obtained in India. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**(9):3284-3290.
18. Laupland KB, Parkins MD, Church LD, Gregson DB, Louie TJ, Conly JM, *et al.* Population-based epidemiological study of infections caused by carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary Health Region: Importance of metalo-β-lactamas (MBL)-producing strains. *JID* 2005; **192**:1606-12.
19. Lagatolla C, Tonin EA, Bragadin CM, Dolzain L,Gombac F, Bearzi C, *et al*. Endemic carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* with acquired metalo-β-lactamase determinants in European hospitals. *Emerging infectious diseases* 2004; **10**:535-538.
20. Kucukates E. Antimicrobial resistance among gram-negative bacteria isolated from intensive care units in a cardiology institute in Istanbul, Turkey. *Jpn J Infect Dis* 2005; **58**:228-231.
21. Naas T, Philippon L, Poirel L, Ronco E, Nordmann P. An SHV-derived extended-spectrum β-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; **43:**1281–1284.
22. Bert F, Branger C, Lambert-Zechowsky N**.**. Identification of PSE and OXA β-lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism. *J Antimicrob Chemother* 2002; **50:**11–18.
23. Livermore DM. β-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol* Rev 1995; **8**:557–584.
24. Dubois V, Arpin C, Noury P, Andre C, Coulange L, Quentin C. Prolonged outbreak of infection due to TEM-21-producing strains of *Pseudomonas aeruginosa* and Enterobacteria in a nursing home. *J Clin Microbiol*, 2005; **43**:4129-4138.

25. Empel J, Filczak K, Mrówka A, Hryniewicz W, Livermore DM, Gniadkowski M. Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections with PER-1 extended-spectrum ß-lactamase in Warsaw, Poland: Further evidence for an international clonal complex. *J Clin Microbiol* 2007; **45**:2829-2834.
26. Kolayli F, Gacar G, Karadenizli A, Sanic A, Vahaboglu H. PER-1 is still widespread in Turkish hospitals among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. *FEMS Microbiology Letters* 2005; **249**:241.
27. Claeys G, Verschraegen G, Baere T, Vaneechoutte. PER-1 β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in an intensive care unit. *J Antimicrob Chemother,* 2000; **45**:919-931.
28. Endimiani A, Luzzaro F, Pini B, Amicosante G, Rossolini GM, Toniolo AQ. *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: risk factors and treatment outcome related to expression of PER-1 extended-spectrum ß-lactamase, *BMC Infect Dis* 2006; **6**: 52-61.
29. Yamano Y, Nishikawa T, Fujimura T, Yutsudou T, Tsuji M, Miwa H. Occurrence of PER-1 producing clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Japan and their susceptibility to doripenem. *The J Antibiotics* 2006; **59**:791-796.
30. Strateva T, Ouzounova-Raykova V, Markova B, Todorova A, Marteva-Proevska Y, Mitov I. Problematic clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from the university hospitals in Sofia, Bulgaria: current status of antimicrobial resistance and prevailing resistance mechanisms. *J Med Microbiol* 2007; **56**:956-963.
31. Lee S, Park Y, Kim M, Lee HK, Han K, Kang CS, Kang MW. Prevalence of Ambler class A and D ß-lactamases among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Korea. *J Antimicrob Chemother* 2005; **56**:122-127.
32. Girlich D, Naas T, Leelaporn A, Poirel L, Fennewald M, Nordmann P. Nosocomial spread of the integron-located *veb-1*–like cassette encoding an extended-spectrum β-Lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* in Thailand. *CID* 2002; **34**:603-611.
33. Sturenberg E, Mack D. Extended-spectrum ß-lactamases: implications for clinical microbiology laboratory, therapy and infection control. *J Infect*, 2003; **47**:273-295.