

## بررسی مولکولی بتالاکتامازهای PER، VEB، SHV، 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 شوریج

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 می آیند. آنزیم PER و VEB به دلیل فعالیت بتالاکتامازی وسیع الطیف (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، TEM در سویه های *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 آنتی بیوتیکی سویه های ایزوله شده به روش انتشار در آگار (Kirby-Bauer) نسبت به آنتی بیوتیک های سفتریوزوکسیم، آمیکاسین، جنتامیسین، سیپروفلوکساسین، پپراسیلین، پپراسیلین-تازوباکتام، سفتریاکسون، سفوتاکسیم، سفتازیدیم و ایمپنم تعیین گردید. سپس MIC این سویه ها نسبت به سفتازیدیم و ایمپنم به روش (CLSI) Microbroth dilution بررسی شد. سویه های دارای  $MIC_{CAZ} \geq 16 \mu g/ml$  جهت PCR ژن های بتالاکتاماز SHV، TEM، PER و VEB مورد بررسی قرار گرفتند.

**یافته ها:** از ۱۰۰ سویه مورد بررسی ۶ سویه دارای  $MIC_{IMP} \geq 4$  بودند. نتایج آنتی بیوگرام نشان داد که ۴۲٪ از سویه ها به سفتازیدیم مقاوم بوده و ۴۶٪ از سویه ها دارای  $MIC_{CAZ} \geq 16$  بودند. با توجه به آزمون PCR از میان ۴۶ سویه دارای  $MIC_{CAZ} \geq 16$  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 ایمپنم مؤثرترین دارو بر علیه سویه های *P. aeruginosa* جدا شده از عفونت های زخم می باشد. 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*

**مقدمه:**

با مصرف کلینیکی آنتی‌بیوتیک‌ها سویه‌های *Pseudomonas aeruginosa* بیمارستانی دارای مقاومت چندگانه نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها (MDR) در سراسر جهان به طور فزاینده‌ای انتشار یافته است (۱). نفوذپذیری کم پروتئین‌های غشای خارجی (OMPs)، تولید بتالاکتاماز AmpC کروموزومی و تغییر در سیستم‌های تراوشی (efflux pumps) از عوامل اصلی مقاومت ذاتی این باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌هاست (۲). یکی از راه‌های ایجاد مقاومت *P. aeruginosa* نسبت به بتالاکتام‌ها تولید آنزیم بتالاکتاماز می‌باشد که معضلات بسیاری را در درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری ایجاد کرده است. متأسفانه مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها به دلیل وجود مکانیزم‌های ذاتی مقاومت مانند AmpC و اکتساب ژن‌های آنزیم بتالاکتامازی در *P. aeruginosa* روز به روز در حال افزایش است (۳ و ۲).

بتالاکتامازها در *P. aeruginosa* بر اساس طیف اثر بر آنتی‌بیوتیک‌ها به سه دسته تقسیم بندی شده‌اند: بتالاکتامازهای با طیف اثر محدود که باعث هیدرولیز پنی‌سیلین‌ها و سفوپرازون می‌شوند. بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) که باعث هیدرولیز مونوباکتام‌ها و سفمها می‌گردند و متالوبتالاکتامازها که بر تمامی بتالاکتام‌های آنتی‌سودوموناسی به جز مونوباکتام‌ها مؤثرند (۳ و ۲). بتالاکتامازها طبق تقسیم بندی Ambler به چهار دسته A تا D تقسیم می‌شوند که نوع A, C و D سرین بتالاکتاماز هستند در حالیکه نوع B متالوبتالاکتاماز است. ESBL‌ها از بتالاکتامازهای کلاس A هستند که توانایی هیدرولیز سفالوسپورین‌های نسل سوم و مونوباکتام‌ها را دارند اما قادر به هیدرولیز کرباپنم‌ها نمی‌باشند. بیشتر این آنزیم‌ها مشتقات بتالاکتامازهای SHV و TEM با یک یا چند تغییر در اسیدهای آمینه آنها می‌باشند که آنزیم TEM-1 و مشتقات آن بیشتر در انتروباکتریاسه و بتالاکتامازهای مشتق از SHV بیشتر در *K. pneumoniae* گزارش شده‌اند: در حالیکه آنزیم‌های ESBL نوع PER و VEB علاوه بر انتروباکتریاسه در *P. aeruginosa* نیز با فراوانی بیشتری یافت شده‌اند (۷-۴).

بتالاکتاماز PER-1 برای اولین بار در سال ۱۹۹۱ در یک بیمار ترکیه‌ای بستری در یکی از بیمارستان‌های فرانسه گزارش شد. آنزیم PER-1 تنها در ۲۰-۱۸٪ اسیدهای آمینه با TEM و SHV شباهت داشته و قادر به هیدرولیز پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌هاست و فعالیت آن توسط کلاولانیک اسید نیز باز داشته می‌شود (۸ و ۹). این آنزیم به دلیل فعالیت ESBL زیادی

که بر بتالاکتام‌های ضد سودوموناسی دارد، اهمیت کلینیکی قابل توجهی داشته و در اروپا و آسیا انتشار یافته است (۷ و ۸ و ۱۰ و ۱۱ و ۱۲). با اینکه این آنزیم بیشتر در ترکیه شایع است در فرانسه، ایتالیا و بلژیک هم انتشار یافته است (۱۳). اخیراً در ایتالیا سویه *P. aeruginosa* مولد PER-1 یافت شده است که دارای ژن VIM-2 که یک کرباپنماز است نیز می‌باشد که در نتیجه این ارگانیسم به کلیه آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم است (۱۴). آنزیم PER-1 هم بر کروموزوم باکتری و هم بر روی پلازمید یافت شده است. با توجه به اینکه این آنزیم در باکتری‌های مختلفی گزارش شده است لذا ژن این آنزیم بر روی عناصر قابل انتقال واقع شده است (۱۵). بتالاکتاماز VEB-1 نیز در ۳۸٪ توالی اسیدهای آمینه با PER شباهت دارد. این آنزیم عامل مقاومت بالا نسبت به سفنازیدیم، 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 می‌رسد که منشأ آن از جنوب آسیا است (۱۳ و ۱۶ و ۱۷).

با توجه به اهمیت *P. aeruginosa* در ایجاد عفونت‌های زخمی در بیماران بستری در بیمارستان و اهمیت بتالاکتامازها در ایجاد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در این باکتری و نیز انتشار ژن‌های این آنزیم‌ها در کشورهای همسایه مانند ترکیه و با توجه به اینکه تاکنون مطالعه‌ای در این زمینه در ایران صورت نگرفته است، فراوانی ژن‌های بتالاکتاماز نوع PER, VEB, TEM و SHV با استفاده از آزمون PCR در سویه‌های *P. aeruginosa* مقاوم جدا شده از نمونه‌های زخم از دو بیمارستان تهران مورد بررسی قرار گرفت.

**مواد و روش‌ها:**

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 عفونت‌های زخم بود. پس از انجام تست‌های بیوشیمیایی، مقاومت سویه‌های *P. aeruginosa* جدا شده از زخم نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفتیزوکسیم (ZOX)، آمیکاسین (AN)، جنتامیسین (GM)، سیپروفلوکساسین (CIP)،

استفاده شد. الکتروفورس نمونه ها در ژل ۱٪ آگارز انجام شده و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید نتایج با UV مشاهده شد.

### یافته ها:

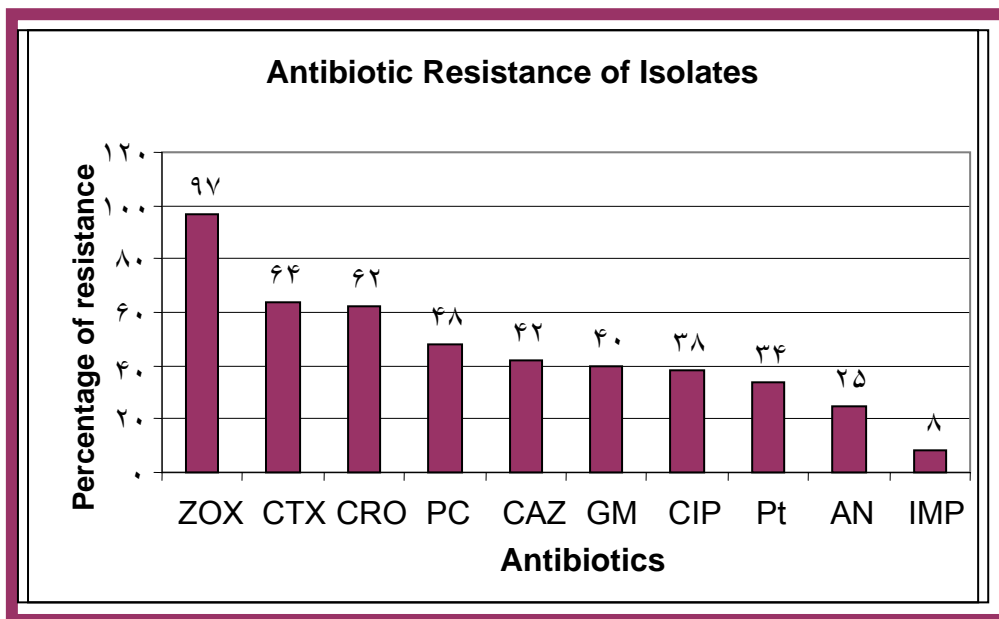
با توجه به نتایج به دست آمده در این بررسی بیشترین میزان مقاومت مربوط به آنتی بیوتیک سفتریوکسیم و کمترین میزان مربوط به ایمی پنم بود (نمودار ۱). در رابطه با ایمی پنم تنها ۶٪ از ۱۰۰ سویه مورد بررسی  $MIC \geq 4 \mu g/ml$  نشان دادند. میزان مقاومت به سفنازیدیم ۴۲٪ مشاهده شد که برای سویه های دارای قطر هاله مساوی و کمتر از ۲۰ میلیمترکه نمونه های حساس و حدواسط را نیز در بر می گیرد،  $MIC$  سفنازیدیم تعیین شد و نتایج نشان داد که ۴۶٪ از سویه ها دارای  $MIC \geq 16 \mu g/ml$  (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 ۹۲۵، ۸۶۱، ۶۴۳ و ۲۳۱ جفت باز بود (شکل ۱). از بین ۴۶ سویه دارای  $MIC \geq 16 \mu g/ml$  نسبت به سفنازیدیم نیز ۶ (۱۳٪)، ۵ (۱۱٪)، ۵ (۱۱٪) و ۱۳ (۲۸٪) سویه در آزمون PCR به ترتیب حاوی ژن های VEB, PER, TEM و SHV بودند که همه آنها نیز  $MIC \geq 64 \mu g/ml$  داشتند. چهار نمونه که دارای  $MIC \geq 256$  نسبت به سفنازیدیم بودند در PCR برای دو ژن همزمان مثبت شدند و یک نمونه نیز با  $MIC = 64 \mu g/ml$  دارای هر ۴ ژن بود. در نمونه های جدا شده از مرکز طبی کودکان هیچکدام از ژن های مورد مطالعه مشاهده نشد.

پیراسیلین (PC)، پیراسیلین-تازوباکتام (Pt)، سفتریاکسون (CRO)، سفوتاکسیم (CTX)، سفنازیدیم (CAZ) و ایمی پنم (IMP) (تهیه شده از شرکت BBL) به روش انتشار در آگار (Kirby-Bauer) و سپس MIC سویه ها نسبت به آنتی بیوتیک های سفنازیدیم و ایمی پنم با استفاده از روش Microbroth dilution با توجه به پروتوکل CLSI تعیین گردید. از سویه *P. aeruginosa* ATCC 27853 جهت کنترل روش های آنتی بیوگرام و MIC استفاده شد. DNA سویه های دارای  $MIC \geq 16 \mu g/ml$  نسبت به سفنازیدیم به روش فنل-کلروفورم جهت آزمون PCR استخراج شد؛ بدین صورت که سوسپانسیون باکتری در بافر لیز حاوی SDS و آنزیم پروتیناز K در دمای  $56^{\circ}C$  آنکوبه و پروتئین های آن با مخلوط فنل-کلروفورم-ایزواکیل 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  $25 \mu l$  (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. pneumoniae* 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 پروفیسور نوردمن، فرانسه) جهت کنترل در آزمون PCR استفاده گردید. از مارکر 100bp ladder (Fermentase) جهت تأیید وزن مولکولی محصولات تکثیر شده

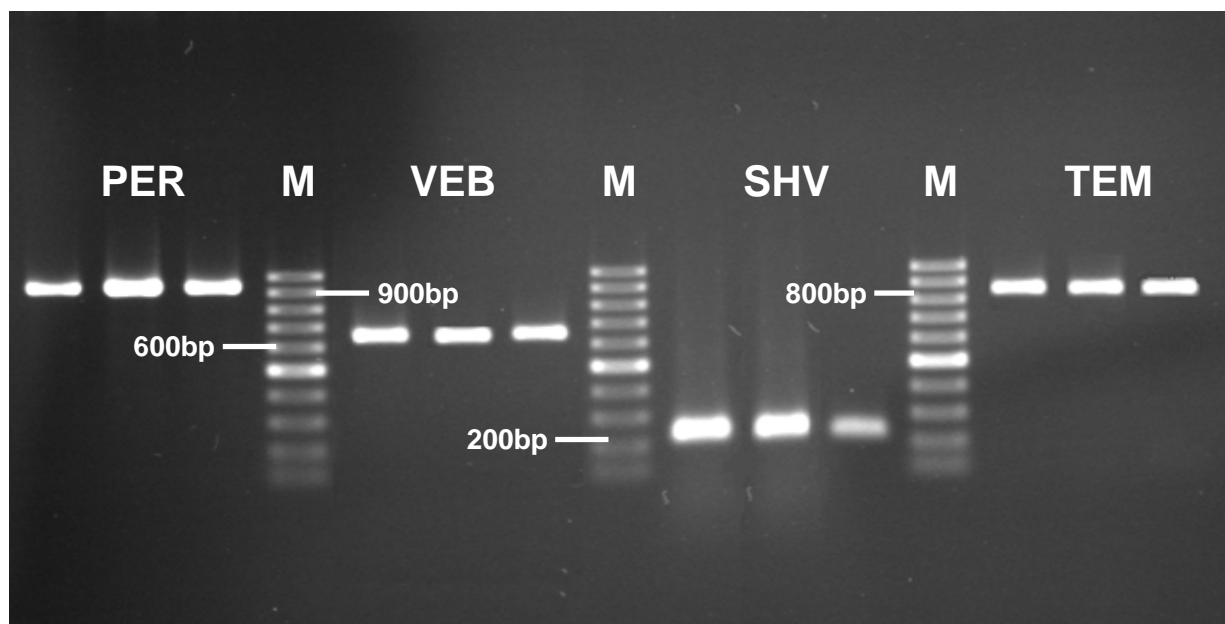
جدول ۱: توالی پرایمرها و دماهای مورد استفاده در آزمون PCR ژن های  $bla_{PER}$ ,  $bla_{VEB}$ ,  $bla_{SHV}$  و  $bla_{TEM}$

Primers	Sequence (5' to 3')	PCR			Cycles	Gene
		Denaturation	Annealing	Extension		
VEB-1A	CGACTTCCATTCCCGATGC	$95^{\circ}C$	$55^{\circ}C$	$72^{\circ}C$	۳۰	$bla_{VEB}$ ۶۴۳bp
VEB-1B	GGACTCTGCAACAAATACGC	۱ min	۱ min	۱ min		
PER-A	ATGAATGTCAATATAAAAGC	$94^{\circ}C$	$43^{\circ}C$	$72^{\circ}C$	۳۵	$bla_{PER}$ ۹۲۵bp
PER-B	AATTTGGGCTTAGGGCAGAA	۳۰ s	۱ min	۱ min		
TEM-A	GAGTATTCAACATTTCCGTGTC	$94^{\circ}C$	$45^{\circ}C$	$72^{\circ}C$	۳۰	$bla_{TEM}$ ۸۶۱bp
TEM-B	TAATCAGTGAGGCACCTATCTC	۳۰s	۱ min	۱ min		
SWSHVA	AAGATCCACTATCGCCAGCAG	$94^{\circ}C$	$60^{\circ}C$	$72^{\circ}C$	۳۰	$bla_{SHV}$ ۲۳۱bp
SWSHV-B	ATTCAGTTCCGTTTCCAGCGG	۳۰ s	۱ min	۱ min		

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



شکل ۱: الکتروفورز محصول PCR ژن‌های مورد بررسی بر روی ژل آگارز (۱٪)



### بحث:

زخم ۴۲٪، ۳۷٪ و ۸٪ تعیین شد. به دلیل اینکه ایمنی پنم در کشور ما یک آنتی بیوتیک بیمارستانی بوده و بدون تجویز پزشک مصرف نمی‌شود لذا مقاومت به این دارو خوشبختانه در ایران نسبت به سایر کشورها از قبیل ترکیه، کانادا و ایتالیا (۱۸-۲۰) پایین تر است. همچنین مقاومت در سویه‌های جدا شده از کودکان با توجه به سن کم آنها و در نتیجه مصرف کمتر آنتی بیوتیک در آنها کمتر می‌باشد.

با توجه به اهمیت *P. aeruginosa* در عفونت‌های بیمارستانی بررسی حضور و تعیین مقاومت این باکتری در سویه‌های جدا شده از زخم نشان داد که مقاومت در این سویه‌ها بالاست بطوریکه مقاومت نسبت به سفنازیدیم و سیپروفلوکساسین و ایمنی پنم در کل سویه‌ها به ترتیب ۲۴٪، ۱۹٪ و ۵٪ بوده در حالیکه در نمونه‌های

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 و SHV 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 می باشند برای درمان عفونت های بیمارستانی ناشی از این سویه ها استفاده از یک کرباپنم همراه با یک آنتی بیوتیک غیربتالاکتامی یا جهت جلوگیری از انتشار سویه های مقاوم به این آنتی بیوتیک ها از یک بتالاکتام در ترکیب با یک بازدارنده بتالاکتاماز پیشنهاد می گردد. بطوریکه در گزارشات قبلی با جایگزینی سفنازیدیم با پیراسیلین-تازوباکتام فراوانی ESBL ها کاهش یافته است (۳۳). اما جهت جلوگیری از شیوع سویه های مقاوم به داروهای جدید همواره مصرف آنها باید کنترل شود و سویه های تحت درمان دائما مورد بررسی قرار گیرند.

تشخیص فنوتیپی ESBL ها توسط کلاولانیک 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 کلاولانان 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 (۲۱ و ۲۱) و TEM نیز در سویه های محدودی از این باکتری در فرانسه گزارش شده است (۲۲) در حالیکه 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* بیشتر کروموزومی 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 و ۹). 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 (۲۶ و ۲۷). اما نسبت به ژاپن، کره و بلغارستان بیشتر است (۲۹-۳۱). فراوانی VEB نیز در این مطالعه نسبت به کشورهای مثل تایلند، بلغارستان کمتر می باشد و شیوع این آنزیم در جنوب آسیا مشاهده شده است (۳۰ و ۳۲). با این وجود بر خلاف سایر کشورها فراوانی بتالاکتاماز SHV در سویه های زخم مورد بررسی در این مطالعه از انواع دیگر بیشتر بود.

### فهرست مراجع:

- Chanawong A, M'zali FH, Heritage J, Lulitanond A, Hawkey PM. SHV-12, SHV-5, SHV-2a and VEB-1 extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacteria isolated in a university hospital in Thailand. *J Antimicrob Chemother* 2001; **48**:839-852.
- Rossolini GM, Mantegoli E. Treatment and control of severe infections caused by multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect* 2005; **11**:17-32.
- 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.
- Howard C, Daal A, Kelly G, Schooneveldt J, Nimmo G, Giffard PM. Identification and minisequencing-based discrimination of SHV

- $\beta$ -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 21<sup>st</sup> 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  $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with class A  $\beta$ -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  $\square$  hydrolyzing third-generation cephalosporins. *Biochem J* 1998; **15**:1443–1449.
  13. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-Spectrum  $\beta$ -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. Tn5393d, A complex Tn5393 derivative carrying the PER-1 extended-spectrum  $\beta$ -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  $\beta$ -lactamase *bla*<sub>VEB</sub> 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 metallo- $\beta$ -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 metallo- $\beta$ -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  $\beta$ -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; **43**:1281–1284.
  22. Bert F, Branger C, Lambert-Zechowsky N.. Identification of PSE and OXA  $\beta$ -lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism. *J Antimicrob Chemother* 2002; **50**:11–18.
  23. Livermore DM.  $\beta$ -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  $\beta$ -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, Vanechoutte. PER-1  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -Lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* in Thailand. *CID* 2002; **34**:603-611.
33. Sturenberg E, Mack D. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: implications for clinical microbiology laboratory, therapy and infection control. *J Infect*, 2003; **47**:273-295.