

شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی و بتالاکتاماز طیف گسترده تیپ VEB-1 در ایزوله های سودوموناس آئروجینوزا جدا شده از بیماران بستری در بخش مراقبت های ویژه

یونس خلیلی: گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
محمد نقی اخی: گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران، نویسنده رابط:

E-mail: M_T_Akhi@yahoo.com

رضا قوطاسلو: گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
محمد آقا زاده: گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
بهروز نقیعی: مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
مجید پرنور: گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

دریافت: ۸۹/۱/۲۱، پذیرش: ۸۹/۱۰/۱۵

چکیده

زمینه و اهداف: تولید آنزیمهای بتالاکتاماز وسیع الطیف یکی از دلایل بروز مقاومت دارویی در ایزوله های سودوموناس آئروجینوزا است. این مطالعه جهت بررسی الگوهای حساسیت آنتی بیوتیکی و حضور ژن *bla* VEB-1 در ایزوله های بیمارستان امام رضا (ع) و شهید مدنی شهر تبریز انجام شد.
مواد و روش ها: در طول یکسال (۱۳۸۷-۱۳۸۸) ۸۵ ایزوله سودوموناس آئروجینوزا از بیماران بستری در بخش ICU مرکز آموزشی درمانی امام رضا (ع) و شهید مدنی تبریز جدا گردیده و توسط تست های روتین باکتریولوژیک تعیین هویت شدند. سپس الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی آنها با دیسک های مختلف تعیین گردید. ایزوله های مقاوم به سفنازیدیم توسط تست تاییدی برای تولید ESBL با روش CDT تحت مطالعه قرار گرفته و نیز وجود ژن *bla* VEB-1 با روش PCR بررسی گردید. از سویه های استاندارد سودوموناس آئروجینوزا 10.2 به عنوان کنترل مثبت ژن *bla* VEB-1 استفاده شد.
یافته ها: چهل و سه ایزوله (۵۰/۵٪) مقاوم به سفنازیدیم بودند. هفتاد و نیم درصد مقاوم به سفوتاکسیم و ۱۷/۶٪ مقاوم به ایمپنم بودند که به ترتیب بیشترین و کمترین مقاومت را داشتند. هفتاد و نه درصد ایزوله ها تولیدکننده آنزیم های ESBL بودند. از ایزوله های مقاوم به سفنازیدیم ۱۳/۹٪ حاوی ژن *bla* VEB-1 بودند.
نتیجه گیری: با در نظر گرفتن مقاومت بالا نسبت به سفالوسپورین های نسل سوم و چهارم در ایزوله های سودوموناس آئروجینوزا، پرهیز از مصرف بی رویه آنتی بیوتیک ها در درمان بیمارها با عوامل باکتریائی تولید کننده ESBLs اجتناب ناپذیر است.

کلید واژه ها: مقاومت آنتی بیوتیکی، سودوموناس آئروجینوزا، ESBL، *bla* VEB-1

مقدمه

وسیع الطیف می تواند تهدید کننده باشد (۲). سودوموناس آئروجینوزا بر طبق گزارش CDC دومین عامل شایع پنومونی بیمارستانی، سومین عامل شایع عفونت ادراری بیمارستانی و هفتمین عامل شایع باکتری می باشد. در سراسر دنیا بخش مراقبت های ویژه (ICU) دارای بیشترین و شدیدترین عفونت های بیمارستانی است. میزان مقاومت آنتی بیوتیکی نیز در این بخش بالا است. سودوموناس آئروجینوزا یکی از شایع ترین پاتوژن های جدا شده از ICU است (۳). چندین ریسک فاکتور در عفونت اکتسابی ناشی از این باکتری در بخش ICU دخیل است

سودوموناس آئروجینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) یک باکتری گرم منفی، اکسیداز مثبت، غیر تخمیر کننده و هوازی است که معمولاً در محیط های مرطوب زندگی می کند. این باکتری نیازهای تغذیه ای کمی دارد و می تواند به راحتی در اکثر محیط های کشت باکتریولوژیک رشد کند (۱). کلونیزاسیون باکتری در بدن از نظر سلامتی معمولاً مشکلی ایجاد نمی کند اما افزایش سطح کلونیزاسیون در صورت وجود کاهش سطح ایمنی، بیماری های زمینه ای (دیابت، سوختگی، سرطان، کیستیک فیبروزیس و ...)، بستری طولانی مدت در بیمارستان و استفاده از آنتی بیوتیک های

سفییم (30µg)، پیراسیلین- تازوباکتام (100µg/10µg) جتتاماسین (10µg)، سپروفلوکساسین (5µg)، آزترونام (30µg)، مروپنم (10µg) و ایمی پنم (10µg) (MAST group Ltd, UK) جهت آنتی بیوگرام استفاده شد و نتایج بعد از ۱۸ تا ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد با استفاده از دستورالعمل CLSI مورد بررسی قرار گرفت (۱۱).

کلیه ایزوله های مقاوم به سفنازیدیم برای تأیید تولید ESBL با روش Combined Disk Test (CDT) مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای انجام CDT از دیسک های سفنازیدیم و سفنازیدیم- کلاوولانیک اسید (30µg/10µg)، سفوناکسیم و سفوناکسیم- کلاوولانیک اسید (30µg/10µg)، سفییم و سفییم- کلاوولانیک اسید (30µg/10µg) (MAST, UK) استفاده شد. از ایزوله ها مانند روش آنتی بیوگرام سوسپانسیونی معادل نیم مک فارلند تهیه و روی محیط مولر هیتون آگار کشت داده و دیسک ها در فاصله مناسب (مثلاً ۲۰ میلی متر) از هم قرار داده شدند. ایزوله ها زمانی ESBL مثبت گزارش شدند که قطر هاله عدم رشد ایجاد شده توسط دیسک های حاوی اسید کلاوولانیک پنج یا بیشتر از پنج میلی متر از دیسک های بدون مهار کننده بزرگتر باشد (۱۲). از سویه *P. aeruginosa* ATCC 27853 برای ارزیابی کیفیت دیسک های مورد مطالعه و نیز به عنوان کنترل منفی در روش فنوتیپی و PCR استفاده شد.

DNA ایزوله های مقاوم به سفنازیدیم به روش SDS پروتئیناز K اصلاح شده با (CTAB) استخراج شد (۱۳). سپس واکنش PCR جهت بررسی حضور ژن *bla*_{VEB-1} انجام گرفت، بدین صورت که 1µl از DNA استخراج شده را به Master mix با حجم نهایی 50µl اضافه کرده و نیز به ازای هر واکنش ۲/۲ میکرو-لیتر (50 mM) MgCl₂، ۵ میکرو لیتر بافر 10X، ۱ میکرو لیتر dNTPs mix (10mM)، ۱ واحد از آنزیم Taq DNA (5U/µl) polymerase (Fermentase, Litvania) ۰/۵ میکرو لیتر از هر پرایمر (25µM) (Bioneer, Germany) اضافه گردید.

F: 5'CGACTTCCATTTCCTCCGATGC3'
R: 5'GGACTCTGCAACAAATACGC 3'

(۹ و ۱۱). برای تولید محصول (642bp) برنامه دستگاه ترموسایکلر با ۳۵ سیکل بدین ترتیب تنظیم شد. First Denaturation ۹۴ درجه سانتیگراد ۵ دقیقه، Denaturation بعدی ۹۴ درجه سانتیگراد ۱ دقیقه، Annealing در ۵۲ درجه سانتیگراد بمدت ۵۰ ثانیه، Extension ۷۲ درجه سانتیگراد ۱ دقیقه و Last Extension ۷۲ درجه سانتیگراد ۴ دقیقه و محصول PCR تولیدی را در آگاروز ۱،۱٪ (Sigma, USA) الکتروفورز کرده پس از رنگ آمیزی با اتیدیم بروماید (Fermentase) زیر نور UV بررسی گردید. از سویه سودوموناس آئروجینوزا 10.2 به عنوان کنترل مثبت ژن *bla*_{VEB-1} استفاده شد. از روش های آمار توصیفی (فراوانی - درصد) و با استفاده از نرم افزار آماری SPSS جهت بررسی آماری استفاده شد.

نظیر بستری طولانی مدت، وجود بیماری های زمینه ای شدید و استفاده از روش های تهاجمی از یک طرف و از طرف دیگر استفاده زیاد از آنتی بیوتیک های وسیع الطیف و وجود مقاومت آنتی بیوتیکی با این باکتری مشکلات زیادی را به وجود آورده است (۴). این باکتری با داشتن سیستم Efflux قوی، جذب کم دارو از غشای خارجی و تولید آنزیم های مختلف برای از بین بردن فعالیت آنتی بیوتیک های مختلف نظیر آمینوگلیکوزیدها و فلوروکینولونها و نیز تولید آنزیم های بتالاکتاماز مختلف باعث هیدرولیز آنتی بیوتیک های بتالاکتام می شود. آنزیم های بتالاکتاماز پیوند آمیدی حلقه بتالاکتام را نابود می کنند (۶۵). آنزیم های بتالاکتاماز سودوموناس آئروجینوزا هر یک باعث هیدرولیز دسته خاصی از این آنتی بیوتیک ها می شود. بر طبق طبقه بندی ۴ Amber نوع بتالاکتاماز وجود دارد. بتالاکتاماز کلاس A یا بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) باعث هیدرولیز سفالوسپورین های وسیع-الطیف، خانواده پنی سیلین ها و منوباکتام می شود. کلاس B شامل آنزیم های متالو بتالاکتاماز می باشد که باعث هیدرولیز تمام آنتی-بیوتیک های بتالاکتام به غیر از منوباکتام می شود. کلاس C شامل سفالوسپورینازهای Amp C می باشد که باعث هیدرولیز انواع پنی سیلین ها، آمینو پنی سیلین ها و سفالوسپورین های اولیه می-گردد. کلاس D یا OXA-type بتالاکتامازها باعث هیدرولیز آگراسیلین ها و سایر پنی سیلین های سنتتیک و نیمه سنتتیک می گردد (۷). ژن *bla*_{VEB-1} جزو کلاس A بتالاکتامازها می باشد. آنزیم VEB-1 اولین با در سال ۱۹۹۹ از یک بیمار ویتنامی مبتلا به عفونت ادراری با *E. coli* گزارش گردید (۸). این ژن در بسیاری از کشورهای آسیایی و اروپایی گزارش شده است ولی شایع ترین محل آن جنوب شرقی آسیا است (۹). هدف این مطالعه بررسی شیوع آنزیم VEB-1 در ایزوله های سودوموناس آئروجینوزا از بخش مراقبت های ویژه بیمارستان های آموزشی-درمانی امام رضا (ع) و شهید مدنی شهر تبریز و میزان تولید ESBL و نیز تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی آنها است.

مواد و روش ها

در طی دوره یکساله از تیر ماه ۱۳۸۷ تا تیر ۱۳۸۸ تعداد ۸۵ ایزوله سودوموناس آئروجینوزا بصورت تصادفی از بیماران بستری در بخش های ICU مرکز آموزشی و درمانی امام رضا (ع) و شهید مدنی تبریز جداسازی و با روشهای معمول باکتریولوژیک شناسایی شده و جهت تعیین هویت قطعی در محیط کشت Cetrinide agar (Liofilchem, Italy) کشت و در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد انکوبه گردیدند و سپس ایزوله ها از نظر تولید اکسیداز و تست OF (Merck, Germany) بررسی شدند (۱۰).

جهت تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی از تمام ایزوله ها سوسپانسیونی معادل نیم مک فارلند تهیه و در محیط کشت مولر هیتون آگار (Merck, Germany) کشت داده شد. از دیسک های سفنازیدیم (30µg)، سفوناکسیم (30µg)، سفتریاکسون (30µg)،

جدول شماره ۱: الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سودوموناس آئروجینوزا جداشده از بخش های مراقبت های ویژه مراکز آموزشی-درمانی امام رضا (ع) و شهید مدنی. برحسب تعداد (%).

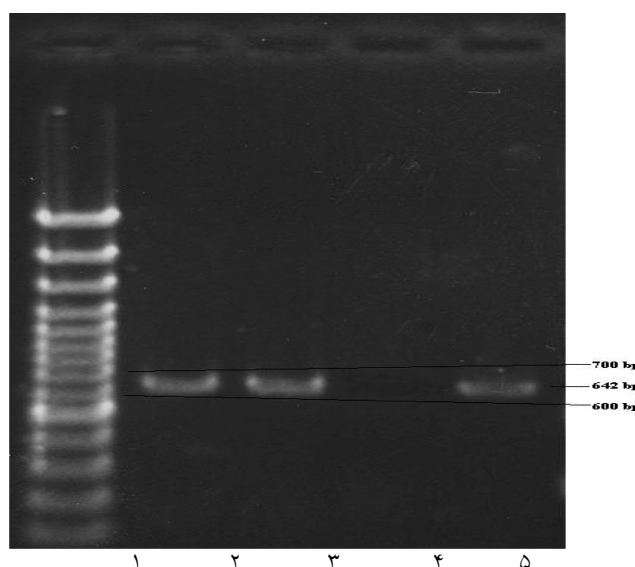
آنتی بیوتیک	ایمی پنم	مروپنم	پیپراسیلین-تازویکتام	سفتازیدیم	جتتامایسین	سفپیم	سیپروفلوکساسین	آزترونام	سفتریاکسون	سفتوتاکسیم
مقاوم	۱۵ (۱۷/۶)	۱۶ (۱۸/۸)	۲۱ (۲۴/۷)	۴۳ (۵۰/۵)	۴۴ (۵۱/۸)	۴۵ (۵۲/۹)	۴۷ (۵۵/۲)	۴۸ (۵۶/۴)	۵۶ (۶۵/۸)	۶۰ (۷۰/۵)
نیمه حساس	۲ (۲/۳)	۴ (۴/۷)	-	-	۲ (۲/۳)	۴ (۴/۷)	۱۱ (۱۲/۹)	۱۳ (۱۵/۲)	۱۴ (۱۶/۴)	۲۲ (۲۵/۸)
حساس	۶۸ (۸۰/۱)	۶۵ (۷۶/۵)	۶۴ (۷۵/۳)	۴۲ (۴۹/۵)	۳۹ (۴۵/۹)	۳۶ (۴۲/۴)	۲۷ (۳۱/۹)	۲۴ (۲۸/۴)	۱۷/۸(۱۵)	۳ (۳/۷)

جدول شماره ۲: الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سودوموناس آئروجینوزا جداشده مولد ژن *bla* VEB-1 از بخش های مراقبت های ویژه مراکز آموزشی-درمانی امام رضا (ع) و شهید مدنی. برحسب تعداد (%).

آنتی بیوتیک	ایمی پنم	مروپنم	پیپراسیلین-تازویکتام	سفتازیدیم	جتتامایسین	سفپیم	سیپروفلوکساسین	آزترونام	سفتریاکسون	سفتوتاکسیم
مقاوم	۱ (۱۷)	۱ (۱۷)	۲ (۳۳)	۶ (۱۰۰)	۴ (۶۷)	۵ (۸۳)	۶ (۱۰۰)	۶ (۱۰۰)	۶ (۱۰۰)	۶ (۱۰۰)
نیمه حساس	-	-	-	-	-	۱ (۱۷)	-	-	-	-
حساس	۵ (۸۳)	۵ (۸۳)	۴ (۶۷)	-	۲ (۳۳)	-	-	-	-	-



شکل شماره ۱: ایزوله سودوموناس آئروجینوزا با هر سه دیسک واکنش مثبت نشان داده است. قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک های حاوی مهار کننده اسید کلاوولانیک (CV) ≥ 5 از دیسک های بدون مهار کننده سفپیم (CPM)، سفتازیدیم (CAZ) و سفتوتاکسیم (CTX) است.



شکل شماره ۲: الکتروفورز ژن VEB-1 در ایزوله های *P. aeruginosa*

ستون ۱: سایز مارکر 100bp
 ستون ۲: کنترل مثبت: *P. aeruginosa* 10.2
 ستون ۳، ۴: ایزوله های واجد ژن VEB-1
 ستون ۵: ایزوله بدون ژن VEB-1

یافته ها

از ۸۵ ایزوله ۵۶ ایزوله از مرکز آموزشی و درمانی امام رضا و ۲۹ ایزوله از مرکز آموزشی و درمانی شهید مدنی جمع آوری شد. ۲۵ ایزوله از نمونه های لوله تراشه، ۳۵ از ادار، ۸ از مایع برونش، ۵ از کشت خون، ۳ از خلط، ۶ از زخم، یک از مایع مغزی نخاعی (CSF) و ۲ ایزوله از نمونه مایع جنب بودند. نتایج الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی حاکی از آن است که ۷۰/۵٪ ایزوله ها مقاوم به سفوتاکسیم و ۱۷/۶٪ مقاوم به امی پم بودند که به ترتیب بیشترین و کمترین مقاومت را نشان می دهند (جدول ۱). از ۴۳ ایزوله مقاوم به سفوتازیدیم ۳۴ ایزوله (۷۹٪) با روش CDT تولید کننده ESBL تشخیص داده شدند (شکل ۱). با انجام واکنش PCR روی ایزوله های مقاوم به سفوتازیدیم ۶ ایزوله (۱۳/۹٪) واجد ژن *bla* VEB-1 مشخص گردید (شکل ۲) که همه از نمونه های ادار به دست آمده بودند. الگوی مقاومت این ایزوله ها در جدول شماره ۲ آورده شده است.

بحث

در سراسر دنیا بخش مراقبت های ویژه دارای بیشترین و شدیدترین عفونت های بیمارستانی است. میزان مقاومت آنتی بیوتیکی نیز در این بخش بالا است. سودوموناس آئروجینوزا یکی از شایع ترین پاتوژن های جدا شده از ICU است (۳). اغلب مقاومت های آنتی بیوتیکی در سودوموناس آئروجینوزا بصورت مقاومت به چند دارو (MDR) بروز می کند. از آنجائیکه این مطالعه در بخش ICU انجام شده است و تعداد سودوموناس آئروجینوزا های MDR نسبت به بخش های دیگر بیشتر است لذا نتایج بدست آمده برای الگوی مقاومت و نیز ژن VEB1 از اعتبار بیشتری برخوردار می باشد. از طرف دیگر در این باکتری معمولاً تست (DDST (Double Disc Synergy Test) برای جستجوی ایزوله های تولید کننده ESBL بعلت وجود روش های گوناگون مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های بتا لاکتام دار از نتایج ضعیف تری برخوردار است و به همین دلیل بیشتر بر روی نتایج حاصل از CDT تکیه می شود (۱۲۰). در مطالعه حاضر ۴۳/۵٪ از ایزوله های جدا شده به حداقل ۳ یا بیشتر از ۳ نوع آنتی بیوتیک مختلف مقاوم بودند. سودوموناس آئروجینوزا مقاوم چند دارو به علت استفاده فراوان از آنتی بیوتیک های وسیع الطیف در بخش ICU به وفور دیده می شود. در یونان میزان MDR در بخش ICU ۱۰/۵٪ گزارش شده است (۱۴). و نیز در امریکا طی دوره ۱۰ ساله میزان MDR در سودوموناس آئروجینوزا از ۴٪ در سال ۱۹۹۳ تا ۱۴٪ در سال ۲۰۰۲ افزایش نشان می دهد (۱۵). در سال ۲۰۰۴ در آمریکا میزان MDR ۲۹/۵٪ در ایزوله های سودوموناس آئروجینوزا بخش مراقبت های ویژه گزارش شده است (۱۶). تولید آنزیم های ESBL یکی از علل شایع مقاومت به پنی سیلین های ضد سودومونائی، سفالوسپورین های مختلف و منوباکتام می باشد (۱۷). میزان تولید ESBL در ایزوله های سودوموناس آئروجینوزا

مقاوم به سفوتازیدیم در سال های گذشته در حال افزایش می باشد. در سال ۲۰۰۳ در تایلند ۲۰/۶٪ (۱۸)، در سال ۲۰۰۵ در کره ۲۵/۴٪ (۱۹)، در سال ۲۰۰۶ در بولیوی ۲۳/۴٪ (۲۰) و در سال ۲۰۰۷ در بلغارستان ۲۸/۷٪ (۲۱) در سال ۲۰۰۶ در چین ۴۵/۳٪ بود (۱۲). در مطالعه میرصالحیان و همکاران در سال ۱۳۸۷ میزان تولید ESBL در ایزوله های جدا شده از افراد دچار سوختگی در تهران ۴۰٪ بود (۲۲). این میزان در مطالعه ما ۷۹٪ بود. ژن های گوناگونی بجز VEB-1 که باعث هیدرولیز سفالوسپورین های وسیع الطیف می شوند، در این باکتری بسیار زیاد است. احتمالاً علت میزان بالای تولید آنزیم های ESBL در این مطالعه شیوع بالای سایر ژن ها در این منطقه از کشور و نیز محل جمع آوری نمونه است. چون در بخش ICU میزان مقاومت به آنتی بیوتیک های وسیع الطیف بیشتر از سایر بخش های بیمارستان است. ژن های مختلف موجود در سودوموناس ها به راحتی بین سایر سویه ها منتقل می شوند (۵ و ۲). آنزیم VEB-1 یک بتالاکتاماز وسیع الطیف می باشد که بصورت پلاسمیدی - اینتگرونی منتقل می - شود. ایزوله های واجد این ژن نیز مقاومت بالائی نسبت به سفالوسپورین های وسیع الطیف و منوباکتام ایجاد می کنند (جدول ۲). البته قدرت هیدرولیز کننده گی این ژن نسبت به سفوتاکسیم بیشتر از سفوتازیدیم است (۲۳). مطالعات اپیدمیولوژی حاکی از آن است که این ژن در جنوب شرقی آسیا شایع است طوری که ۴۰٪ - ۸۰٪ ایزوله های سودوموناس آئروجینوزا مقاوم به سفوتازیدیم در کشورهای نظیر تایلند، ویتنام و بنگلادش حاوی ژن *bla* VEB-1 هستند (۲۴ و ۹). میزان شیوع این ژن در کشور های مختلف متفاوت است. این میزان در سال ۲۰۰۸ در انگلستان از ۸۰٪ ایزوله های مقاوم به دست آمده (۲۵) در ۲۰۰۷ در بلغارستان ۳۳/۱٪ (۲۱) در چین در ۲۰۰۶، ۳۸/۶٪ بود (۱۲). در یک مطالعه در سال ۲۰۰۱ در تایلند از ۳۳ ایزوله مقاوم به سفوتازیدیم ۳۱ ایزوله حاوی این ژن بودند (۹). میزان این ژن در مطالعه در سال ۱۳۸۶ در تهران از ۱۱٪ ایزوله های مقاوم به سفوتازیدیم گزارش شده است (۲۶). این میزان همچنین در این مطالعه ۱۳/۹٪ می باشد که همتراز سایر نقاط کشور نظیر تهران می باشد.

نتیجه گیری

با توجه به افزایش موارد ESBLs مثبت و تاثیر آن در افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی سودوموناس آئروجینوزا بخصوص در افراد بستری در بخش ICU، لزوم تشخیص موارد مثبت و تعیین دقیق الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی این ایزوله توصیه می شود. جهت جلوگیری از گسترش کلون های ESBL مثبت که معمولاً به راحتی بین بخش های یک بیمارستان گسترش می یابند باید مکان های احتمالی آلود به سودوموناس آئروجینوزا شناسایی و با مواد ضد عفونی کننده مناسب تمیز شوند. در موارد استفاده از دستگاه های تنفس مصنوعی و استفاده از مواد مختلف برای

تبریز به انجام رسیده است که بدین وسیله از مراکز فوق تشکر و قدردانی می گردد. ما همچنین از کلیه کارکنان بیمارستان های امام رضا (ع) و شهید مدنی بابت مساعدت در جمع آوری ایزوله های مورد مطالعه کمال تشکر و قدردانی داریم و نیز از کلیه افرادی که در انجام این مطالعه ما را یاری کردند از جمله اساتید محترم گروه میکروب شناسی تشکر می کنیم.

شستشوی ریه یا زخم باید توجه شود که آلوده به سودوموناس آئروجینوزا نباشند چون این باکتری بسیار مقاوم است. در صورت مشاهده مقاومت به سفالوسپورین های وسیع الطیف استفاده از یک کارباینم به جای سفالوسپورین همراه با یک آنتی بیوتیک غیر بتالاکتام نظیر آمیکاسین توصیه می شود (۲۷).

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی و مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی

References:

- Goldberg JB. Pseudomonas: global bacteria. *Trends Microbiol* 2000; **8**: 55-57.
- Morrison Aj, Wenzel RP. Epidemiology of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis* 1984; **6**: 627-642.
- Vincent JL, Bihari DJ, Suter PM. The prevalence of Nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of (EPIC) study. EPIC International Advisory committee. *JAMA* 1995; **274**: 639-644.
- Agodi A, Barchitta M, Cipresso R. *Pseudomonas aeruginosa* carriage, colonization, and infection in ICU patients. *Intensive Care Med* 2007; **33**: 1155-1161.
- Livermore DM. Penicillin – binding proteins, porins and outer- membrane permeability of carbenicillin – resistant and susceptible strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol* 1984; **18**: 261-270.
- Sykes RB, Mattew M. The Beta-lactamses of gram negative bacteria and their role in resistance to Beta-lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1976; **2**: 140-145.
- Amber RP. The structure of β -lactamase. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1980; **289**: 321-331.
- 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.
- Givlich D, Nass T, Leelaporn A, Poirel L, Fennewald M, Nordmann P. Nosocomisl spread of the intergron located Veb- 1 like cassette encoding an extended spectrum Beta- lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* in Thailand. *Clin infect Dis* 2002; **34**: 603-611.
- Clinical and Laboratory Standards Institute performance standards for Antimicrobial susceptibility Testing: Document M10 – S15.CLSI. Wayne, PA, USA, 2005.
- Jiang X, Zhang Z, Li M, Zhou D, Ruan F, Ku Y. Detection of extended spectrum beta lactamases in clinical isolates of *Pseudomouas aerugionsa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 2990-2995.
- Van soolingen D, De Haas PEW, Hermans PWM, Van Embden JDA. DNA Fingerprinting of *Mycobacterium Tuberculosis*. *Methods Enzymol* 1994; **236**: 196-205.
- Paramythiotou E, Lucet JC, Timsit JF. Acquisition of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in patients in intensive care units: role of antibiotics with antipseudomonal activity. *Clin Infect Dis* 2004; **38**: 670-677.
- Marilee D, Obritsch M, Douglas N, MacLaren R, Jung R. National Surveillance of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Obtained from Intensive Care Unit Patients from 1993 to 2002. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; **48**: 4606-4610.
- Flamm RK, Weaver MK, Thornsberry C, Jones ME., Karlowky JA, Sahm DF. Factors associated with relative rates of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates tested in clinical laboratories in the United States from 1999 to 2002. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 2431-2436.
- Nordmann P, Guibert M. Extended spectrum Beta-lactamases in *Pseudomonas aerugionsa*. *J Antimicrob Chemother* 1998; **42**: 128-131.
- Chayakulkeeree M, Junsriwong P, Keerasuntonpong A, Tribuddharat C, Thamlikitkul V. Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase producing gram-negative bacilli at Siriraj Hospital, Thailand, 2003. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2005; **36**: 1503-1509.
- Lee S, Park YJ, kim M, Lee HK, Han K. Prevalence of Ambler class A and D beta - lactamases among clinical isolates of *Pseudomonas aerugionsa* in Korea. *J Antimicrob Chemother* 2005; **56**: 122-127.

19. Celenza G, Pellegrini C, Caccamo M. Spread of bla (CTX-M-type) and bla(PER-2) beta-lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals. *J Antimicrob Chemother* 2006; **57**: 975-978.
20. 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.
21. Mirsalehian A. Broad-spectrum Of beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* isolates in burn patient. *Journal of Tehran University of Medical Sciences* 2008; **66**(5): 333-337.
22. Weld Hagen GF, Poirel L, Norman P. Ambler class a extended spectrum Beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* novel developments and clinical impact. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 2003; **47**: 2385-2392.
23. Cao V, Lambert T, Nhu DQ. Distribution of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of Enterobacteriaceae in Vietnam. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; **46**: 3739-3743.
24. Woodford N, Zhang J, Kaufmann ME, Yarde S, Tomas MM. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing VEB-type extended spectrum Beta- lactamases in the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother* 2008; **62**: 1265-1268.
25. Shahcheraghi F, Nikbin S, Shorj F. Molecular studies of PER, VEB, TEM, SHV beta Lactamase-*Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from wound specimens in two hospitals of Tehran. *Iranian Journal of Medical Microbiology* 2008; **1**(4): 21-27.
26. Mimoz O, Elhelali N, Leotaed S, Jacolot A, Laurent F, Nordmann P. Treatment of experimental Pneumonia in rats caused by a PER-1 extended spectrum Beta- lactamase producing strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 1999; **44**: 91-97.
27. Luzzaro F, Mantengoli E, Perill M, Lombardic G, Rosollini GM. Dynamics of a nosocomial outbreak of Multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing the PER-1 extended spectrum Beta-lactamase. *J Clin Microbiol* 2001; **39**(5): 1865-1870.