Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2011; 14(54): 55-61

Prevalence of TEM-1 type beta-lactmase genes in *Pseudomonas aeruginosa strains* isolated from burn infections using Duplex PCR in Shahrekord, 2008

Shojapour M(MSc)[1], Shariati L(MSc)[2], Karimi A(PhD)[3], Zamanzad B(PhD)[4*]

1- Molecular and Medicine research center,Arak University of Medical Sciences & Cellular and Molecular research center, Shahre-kord University of Medical Sciences, Iran.
2- Cellular and Molecular research center, Shahre-kord University of Medical Sciences, Iran.
3- Associated professor, Cellular and Molecular research center, Shahre-kord University of Medical Sciences, Iran.
4- Associated professor, Cellular and Molecular research center, Shahre-kord University of Medical Sciences, Iran.

Received 10 Feb 2010 Accepted 2 Jun 2010

Abstract

Background: Existence of extended spectrum B-lactamase (ESBL) genes plays an important role in spreading B-lactam antibiotic resistance in the producing strains of these enzymes. The resistance of gram-negative bacteria, such as *Pseudomonas aeruginosa*, to different antimicrobial agents, especially B-lactam and carbapenem, has increasingly been reported. This study was conducted to determine the prevalence of TEM-1 beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* isolates through Duplex PCR.

Materials and Methods: In this descriptive-analytic study, 175 *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected from burn patients were subjected to bacteriological tests. The samples were cultured and identified according to standard methods. Then the frequency of ESBL producing strains was determined via the combined disk method. Using boiling method, DNA was extracted and examined for the existence of TEM-1 gene by Duplex PCR.

Results: Out of the 175 *Pseudomonas aeruginosa* isolates, 66 (37.7%) were ESBL positive, 15.15% of which were positive for TEM-1 B-lactamases resistance gene.

Conclusion: Noticing the increasing rate of the ESBLs producing strains, using the appropriate treatment protocol based on the antibiogram pattern of the strains is highly recommended.

Keywords: Extended-spectrum ß-lactamases, ESBL, *Pseudomonas aeruginosa*, TEM-1

*Corresponding author:
Address: Faculty of Medicine, Department of Microbiology and Immunology, Cellular and Molecular research center, Shahre-kord University of Medical Sciences, Iran
Email: bzamanzad@yahoo.com

مقاله پژوهشی
مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال 14، شماره 1 (شماره پیاپی 54)، فروردین و اردیبهشت 1390، 61-55

شیوع ژن بتالاکتاماز TEM-1 در سویه‌های بالینی پسودوموناس آئروژینوزای جدا شده از عفونت‌های سوختگی توسط روش PCR دوگانه- شهرکرد 1387-1386

مانا شجاعپور[1]، لاله شریعتی[2]، دکتر علی کریمی[3]، دکتر بهنام زمان زاد[4]*

1-کارشناس ارشد میکروب شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
2- کارشناس ارشد میکروب شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
3- دانشیار، دکترای تخصصی ویروس شناسی بالینی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
4- دانشیار، دکتری تخصصی میکروب شناسی بالینی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت 88/11/21، تاریخ پذیرش 89/3/12

چکیده

زمینه و هدف: حضور ژن های بتالاکتاماز وسیع الطیف نقش مهمی در ایجاد مقاومت سویه‌های مولد این آنزیم‌ها به آنتی بیوتیک‌های بتا لاکتام ایفا می‌کنند. مقاومت باکتری‌های گرم منفی از جمله پسودوموناس آئروژینوزا نسبت به آنتی بیوتیک‌های مختلف، به خصوص بتا لاکتام و کرباپنم به طور روزافزون گزارش شده است. این مطالعه با هدف بررسی شیوع ژن بتا لاکتالاز TEM-1 در ایزوله‌های پسودوموناس آئروژینوزا توسط روش PCR دوگانه انجام گردید.

مواد و روش‌ها: در این بررسی توصیفی- تحلیلی، 175 ایزوله باکتری پسودوموناس آئروژینوزا که از بیماران سوختگی بستری در بخش سوختگی جمع‌آوری شده بود، مورد بررسی باکتریولوژیک قرار گرفت. نمونه‌ها بر طبق روش‌های استاندارد، کشت و شناسایی گردیدند. سپس، فراوانی سویه‌های تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف، با روش Combined Disk تعیین گردید. DNA با روش جوشانیدن استخراج شده و از نظر وجود ژن TEM-1 توسط روش PCR دو گانه مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: در این مطالعه، از مجموع 175 ایزوله پسودوموناس آئروژینوزا، در 66 ایزوله(37/7 درصد) فنوتیپ بتالاکتاماز وسیع الطیف مثبت مشاهده شد. که از این تعداد، 15/15 درصد دارای ژن مقاومت بتالاکتاماز TEM-1 بودند.

نتیجه گیری: با توجه به شیوع رو به افزایش سویه‌های تولید کننده بتا لاکتامازهای وسیع الطیف، استفاده از پروتکل درمانی مناسب بر اساس تعیین الگوی آنتی بیوگرام سویه‌ها، قویاً توصیه می‌شود.

واژگان کلیدی: بتالاکتاماز وسیع الطیف، پسودوموناس آئروژینوزا، TEM-1

***نویسنده مسئول:** شهرکرد، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، گروه میکروبیولوژی و ایمنولوژی
Email: Bzamanzad@yahoo.com

مقدمه

پسودوموناس آئروژینوزا عامل رایج عفونت‌های بیمارستانی و عامل مقاومت به بسیاری از آنتی بیوتیک ها از جمله بتالاکتام‌ها می‌باشد. مقاومت نسبت به بتالاکتام‌ها در پسودوموناس آئروژینوزا عمدتاً مربوط به تولید بتا لاکتاماز AmpC کروموزومی یا مکانیسم‌های غیر آنزیمی مثل تغییر در نفوذپذیری سیستم پمپ‌های ترشحی یا تغییر در نفوذپذیری غشای خارجی می‌باشد(1، 2). بتالاکتامازها از مهم‌ترین آنزیم‌های مهارکننده داروهای بتالاکتام در باکتری است که با هیدرولیز حلقه بتالاکتام از اتصال آنتی‌بیوتیک به جایگاه هدف جلوگیری می‌کند و باعث ظهور مقاومت می‌گردد(5-3). تا امروز بیش از 340 آنزیم بتا لاکتاماز شناسایی شده است. بر طبق طبقه‌بندی مولکولار که بر اساس توالی نوکلئوتیدها و اسید آمینه در این آنزیم‌ها می‌باشد، امروزه چهار کلاس (A-D) شناخته شده است. کلاس A ، C وD از طریق مکانیسم بر پایه سرین عمل می‌کنند. در حالی که کلاس B یا متالوبتالاکتاماز ها به فلز روی برای فعالیتشان نیازدارند. اکثر ESBL ها (extended spectrum B-lactamases) به کلاس مولکولی A در طبقه بندی Ambler تعلق دارند، ESBL های مشتق از SHV و TEM مربوط به آنزیم های کلاس A می باشند(6). اولین بتالاکتاماز پلاسمیدی در باکتری‌های گرم منفی 1-TEM بود که در اواسط دهه شصت شرح داده شد، 1-TEM از کشت خون بیماری بنام (Temonera) در یونان از اشریشیاکلی ایزوله شد. طی مدت کمی پس از جداسازی بتالاکتاماز TEM، این آنزیم‌ها در سراسر جهان به سرعت انتشار یافتند به طوری که امروزه به عنوان شایع‌ترین مکانیسم مقاومت به داروهای بتالاکتام در باسیل‌های گرم منفی به حساب می‌آیند(7). با توجه به این که شیوع مقاومت‌های آنتی بیوتیکی در بیمارستان‌ها فراوان می‌باشد. از طرفی پسودوموناس آئروژینوزا از مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی است و این باکتری دارای مقاومت بالایی نسبت به طیف وسیعی از مواد ضد میکروبی و آنتی بیوتیک‌های موجود می‌باشد. بررسی تولید بتا لاکتاماز که به عنوان عمده‌ترین راه بروز مقاومت نسبت به بتالاکتام‌ها (پرمصرف ترین آنتی بیوتیکها) مطرح است می‌توان دیدگاه‌های نسبتاً مناسبی از وضعیت مقاومت را در یک منطقه ترسیم نماید. هدف از این مطالعه تعیین فراوانی ژن بتالاکتاماز TEM-1 در ایزوله‌های پسودوموناس آئروژینوزا توسط روش PCR دوگانه می‌باشد.

مواد و روش ها

در این بررسی توصیفی- تحلیلی، از آبان 1386 لغایت اردیبهشت 1387 تعداد 175 ایزوله باکتری پسودوموناس آئروژینوزا از نمونه‌های کلینیکی شامل(زخم، ادرار، خلط، خون) بر اساس تولید پیگمان در محیط نوترینت آگار، تست اکسیداز مثبت، تست OF (تست اکیداتیو- فرمنتاتیو) هوازی مثبت، بی هوازی منفی و وضعیت غیر تخمیری در محیط TSI (Triple Sugar Iron Agar) مجزا گردیدند. ایزوله‌های پسودوموناس آئروژینوزا مجزا شده براساس روش Combined Disk از نظر حضور بتالاکتامازهای وسیع الطیف مورد بررسی قرار گرفتند. در این روش از دیسک‌های مرکب استفاده گردید شامل: یک دیسک سفتازیدیم (30 میکروگرم) و یک دیسک مرکب (30 میکروگرم سفتازیدیم + 10 میکروگرم کلاولانیک اسید)، تهیه شده از شرکت ماست انگلستان، که این دیسک‌ها در فاصله 20 میلی متری از هم در محیط مولر هینتون آگار(مرک) قرار گرفتند. در صورتی که قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک حاوی کلاولانیک اسید پنج یا بیشتر از پنج میلی متر از دیسک سفتازیدیم باشد تولید بتالاکتاماز وسیع الطیف مثبت تلقی می‌شود(8). ایزوله‌هایی که در این مرحله به عنوان سویه مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف شناسایی شدند به روش PCR دوگانه از نظر وجود ژن TEM-1 مورد بررسی قرار دادیم. ابتدا 3 تا 5 کلنی از هر نمونه را داخل ویال اپندورف حاوی 100 میکرولیتر آب مقطر استریل حل نموده و سپس ورتکس کرده، به مدت 15-10 دقیقه در داخل بن ماری جوش(100 درجه سانتی‌گراد) قرار داده شدند. نهایتاً ویال‌ها را به مدت 7 دقیقه

در دور 12000 سانتریفوژ کرده، محلول رویی (سوپرناتنت) ویالها برای انجام واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت(9). برای تعیین ژنوتیپ TEM-1 از آزمایش واکنش زنجیره ای پلیمراز PCR دوگانه استفاده شد. در این روش به طور همزمان از دو جفت پرایمر اختصاصی در یک واکنش PCR استفاده می شود. به منظور تشخیص ژن پلاسمیدی بتالاکتاماز TEM-1 موجود در ایزوله‌های پسودوموناس آئروژینوزا و SrRNA 16 موجود در باکتری‌های مذکور (به عنوان کنترل داخلی)، از جفت پرایمر TEM-1 و یک جفت پرایمر SrRNA 16 در یک واکنش PCR استفاده گردید.

مخلوط اصلی واکنش PCR با حجم نهایی 25میکرولیتر، محتوی (2 میکرولیتر کلرید منیزیوم، 2/5 میکرولیتربافر PCR، 0/5 میکرولیتر dNTPs، 17/3 میکرولیترآب مقطر، 1 میکرولیتر پرایمر رفتTEM-1، 1 میکرولیتر پرایمر برگشتTEM-1، 0/3 میکرولیتر پرایمر رفت 16SrRNA، 0/3 میکرولیتر پرایمر برگشت 16SrRNA و 0/1 میکرولیتر آنزیم Taq پلیمراز) تهیه شد و نهایتاً به هر میکروتیوپ یک میکرولیتر DNA الگو اضافه گردید. (کلیه مواد از شرکت فرمنتاز تهیه شده است)توالی پرایمر و دماهای مورد استفاده بر طبق مطالعات سایر محققین انتخاب گردید(12-10)(جدول 1).

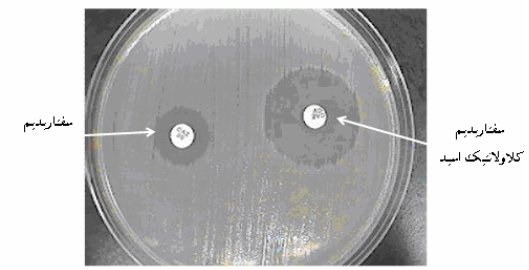
جدول 1: توالی پرایمر ها و دماهای مورد استفاده در جدول زیر آمده است:

پرایمر	توالی پرایمر	مراحل واکنش PCR			تعداد چرخه	ژن (جفت باز)
		دناتوریشن	آنلینگ	اکستنشن		
TEM-1(A)	ATA AAA TTC TTG AAG ACG AAA	94C° 1min	52 C° 1min	72 C° 1/5min	30	1079
TEM-1(B)	GACAGTTAC CAA TGC TTA ATC A					
16SrRNA (A)	GGAATTCAAATGAATTGA CGGGGGC					479
16SrRNA (B)	CGGGATCCCAGGCCCGGGAAC GTATTCAC					

در ایـن مطالعـه از سـوش کنتـرل مثبـت کلبـسیلا پنومونیـــه (ATCC 700603) تهیـــه شـــده از مرکـــز پژوهش‌های علمی و صـنعتی تهـران و سـوش کنتـرل منفـی اشرشیاکلی(ATCC 35218) انستیتو پاستور استفاده گردید پس از پایان یافتن مراحل PCR، به منظور مشاهده بانـدهای مجـزا شـــده از الکتروفـورز بـا ژل پلـی اکریـل آمیـد 8درصداستفاده شد.

یافته ها

در این مطالعه 175 ایزوله پسودوموناس آئروژینوزا از نمونه‌های مختلف کلینیکی شامل: 101 مورد (57/7 درصد) ترشحات زخم، 38 مورد (21/7 درصد) نمونه ادرار، 28مورد (16 درصد) نمونه خلط و 8 مورد(4/6 درصد) نمونه خون ایزوله گردید. در روش دیسک دو تایی از 175 ایزوله پسودوموناس آئروژینوزا، 66 ایزوله (37/7 درصد) فنوتیپ بتالاکتاماز وسیع الطیف مثبت بودند و 109 ایزوله (62/3 درصد) فنوتیپ منفی گزارش شدند(شکل1).



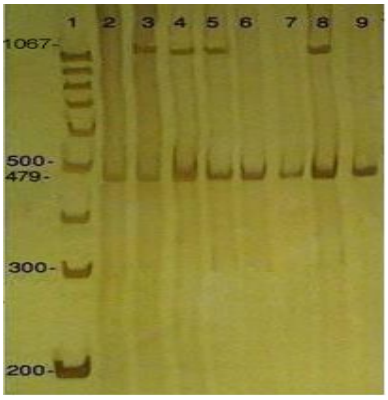
شکل 1. تست فنوتیپی تائیدی به روش دیسک دوتایی

آزمون مجذور کای نشان داد که بین وجود فنوتیپ بتالاکتاماز وسیع الطیف و نوع نمونه بالینی ارتباط معنی‌داری وجود دارد($p<0/001$). به طوری که فراوانی فنوتیپ مثبت بتالاکتاماز وسیع الطیف در نمونه‌های خلط و خون بیشتر از نمونه‌های زخم و ادرار می‌باشد(جدول 2).

جدول 2. توزیع فراوانی سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزای تحت بررسی بر اساس فنوتیپ ESBL و نوع نمونه

نوع نمونه فراوانی بتالاکتاماز وسیع الطیف	زخم		ادرار		خلط		خون		
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	جمع
فنوتیپESBLمثبت	33	32/7	9	23/7	17	60/7	7	87/5	66
فنوتیپESBLمنفی	68	67/3	29	76/3	11	39/3	1	12/5	109

همچنین ارزیابی نتایج PCR از میان 66 سویه بتالاکتاماز وسیع الطیف مثبت، نشان می‌دهد 10 ایزوله(15/15 درصد) واجد ژن TEM-1 می‌باشند.



شکل 2:الگوی الکتروفورز محصولات Duplex-PCR قطعات TEM-1 و 16S rRNA سویه های پسودوموناس آئروژینوزا
1: مارکر 100 bp(SM0241)، 2:کنترل منفی، 3: کنترل مثبت؛ 4، 5 و 8 : نمونه های مثبت برای ژن bla_{TEM-1} ؛ 6،7و9:نمونه های منفی برای ژن bla_{TEM-1}

بحث

در این مطالعه تعداد 175 ایزوله باکتری پسودوموناس آئروژینوزا مورد بررسی قرار گرفت. از این تعداد، 101 ایزوله از کشت زخم، 38 ایزوله از کشت ادرار، 28 ایزوله از کشت خلط و 8 ایزوله از کشت خون مجزا گردید.

در این بررسی 37/7 درصد سویه‌های ایزوله شده تولید کننده بتالاکتاماز وسیع الطیف بودند. از طرفی میزان شناسایی فنوتیپ بتالاکتاماز وسیع الطیف در سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزا در سال 2001 در تایلند در مطالعه چاناونگ و همکاران، 20/6 درصدگزارش گردید(13). در کره در مطالعه لی و همکاران در سال 2005، 25/4 درصد بتالاکتاماز وسیع الطیف مثبت بودند(14). در سال 2006 در بولیوی در مطالعه انجام شده توسط سلنزا و همکاران 23/4 درصد سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزا فنوتیپ بتالاکتاماز وسیع الطیف مثبت بودند(15). در بررسی انجام شده توسط جیانگ و همکاران در سال 2006 در چین 45/33 درصد و همچنین درایران در مطالعه میر صالحیان در سال 2008، 40 درصد سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزا بتالاکتاماز وسیع الطیف مثبت گزارش شدند(16، 17). با مقایسه نتایج حاصل از این تحقیق و نتایج مطالعات قبل، آمار به دست آمده نشان دهنده آن است که درصد سویه‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف مثبت رو به افزایش است. و این افزایش می‌تواند در نتیجه مصرف بیش از حد و طولانی مدت سفالوسپورین های وسیع الطیف باشد در درمان بیماران و کسب مقاومت در سویه‌های باکتریایی باشد. به طور کلی فاکتورهای خطر متعددی در افزایش باکتری‌های تولید کننده بتالاکتاماز وسیع الطیف نقش دارند که شامل: مصرف بیش از حد و طولانی مدت سفالوسپورین‌های وسیع الطیف، طولانی بودن مدت زمان بستری در بیمارستان، استفاده از کاتترهای عروقی و ادراری می‌باشد(18، 19). امروزه وجود بتالاکتامازهای وسیع الطیف در باکتری‌های جدا شده از بیماران بستری که مقاومت دارویی چندگانه را بیان می‌کنند، یک مساله مهم بهداشتی در اکثر کشورها محسوب می‌شود(20، 21).

روش‌های فنوتیپی تنها می‌توانند نشان دهند که یک بتالاکتاماز وسیع الطیف تولید شده است یا نه، ولی نمی‌توانند تیپ و ساب تیپ‌های یک بتالاکتاماز وسیع الطیف را نشان دهند. لذا انجام تکنیک‌های مولکولی از قبیل PCR جهت تشخیص انواع بتالاکتاماز وسیع الطیف ضروری به نظر می‌رسد. در مطالعه حاضر فراوانی ژن TEM-1 با استفاده از روش PCR، 15/15درصد بود.

در مطالعات انجام شده در سال‌های گذشته فراوانی ژن TEM-1 در پسودوموناس آئروژینوزا کم بوده، به

طوری که در مطالعه کاوا لو و همکاران در سال 1996 در فرانسه و همچنین در مطالعه لی و همکاران در کره در سال 2005 هیچ یک از ایزوله حامل این ژن نبودند(1، 14). همچنین در سال 2002 در مطالعه ای توسط برت و همکاران در فرانسه، 259 ایزوله پسودوموناس آئروژینوزا توسط روش PCR-RFLP بررسی شدند که از این میان TEM(TEM-1,TEM-2) در 1/9 درصد ایزوله‌ها شناسایی شد(22). در ایران در مطالعات شاهچراغی و همکاران در سال‌های 2008 و 2009 به ترتیب 11 و 19 درصد ایزوله‌های پسودوموناس آئروژینوزا حامل ژن TEM بودند، که با نتایج حاصله از تحقیق ما همخوانی دارد(23، 24). این میزان کم در حالی است که این ژن در انتروباکتریاسه به فراوانی دیده می‌شود و به نظر می‌رسد که این آنزیم از انتروباکتریاسه به پسودوموناس آئروژینوزا توسط عناصر متحرک انتقال یافته است(25). در مجموع فراوانی این آنزیم در این مطالعه نسبت مطالعات سایر محققین بیشتر است. لذا انجام تحقیقاتی مشابه در کشور ما جهت اطلاع از وضعیت سویه‌های مقاوم و همچنین ارائه راهکارهاو تدابیر مناسب جهت جلوگیری از انتشار این سویه‌ها ضروری می‌باشد. از طرفی با توجه به این که نتیجه تست فنوتیپی تاییدی 37/7 درصد می‌باشد و نتیجه تست ژنوتیپی 15/5 درصد است، مشخص می‌شود که در ایجاد مقاومت در پسودوموناس آئروژینوزا سایر کلاس‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف دخالت دارند که در مطالعات انجام شده در کشورهای مختلف پنج نوع بتالاکتاماز وسیع الطیف از کلاس A در پسودوموناس آئروژینوزا، شامل(PER, VEB, GES, IBC, SHV) گزارش شده است(26). افزون بر این تنوع روش‌های ژنوتیپی مورد استفاده در تحقیقات نیز می‌تواند از دلایل این اختلاف نتایج باشد.

نتیجه گیری

با توجه به اهمیت پسودوموناس آئروژینوزا در عفونت‌های بیمارستانی و همچنین شیوع بالای سویه‌های تولید کننده بتالاکتاماز وسیع الطیف باید از روش‌های تشخیصی سریع در تعیین این سویه‌ها در آزمایشگاه‌ها به صورت روتین استفاده گردد زیرا این نتایج می‌تواند به عنوان یک راه کار برای پزشکان جهت استفاده از سفالوسپورین‌های وسیع الطیف در درمان عفونت‌ها باشد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش حاصل بخشی از پایان نامه دانشجویی سرکار خانم مانا شجاع پور(به شماره 579) می‌باشد. لذا بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد به دلیل پشتیبانی مالی و کلیه همکارانی که ما را در انجام این تحقیق یاری رساندند تشکر و قدردانی می نماییم.

منابع

1. Cavallo J, Fabre R, Leblanc F, Nicolas-Chanoine M, Thabaut A, Bêtalactamines GdEdlRdPaa. Antibiotic susceptibility and mechanisms of beta-lactam resistance in 1310 strains of pseudomonas aeruginosa: a French multicentre study (1996). J Antimicrob Chemother. 2000 Jul;46(1):133-6.
2. Chen H, Yuan M, Livermore D. Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics amongst Pseudomonas aeruginosa isolates collected in the UK in 1993. J Med Microbiol. 1995 Oct;43(4):300-9.
3. Brooks G, Jawetz E, Melnick J, Adelberg E. Jawetz, Melnick & Adelberg's medical microbiology: Prentice-Hall International; 1995.
4. Lorian V. Antibiotics in laboratory medicine. 2nd ed: Williams & Wilkins; 1986.
5. Murray P. Medical microbiology. 4th ed: Mosby; 2002.
6. Shah A, Hasan F, Ahmed S, Hameed A. Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-negative bacilli producing extended-spectrum beta-lactamases. Res Microbiol. 2004 Jul-Aug;155(6):409-21.
7. Steward C, Rasheed J, Hubert S, Biddle J, Raney P, Anderson G, et al. Characterization of clinical isolates of Klebsiella pneumoniae from 19 laboratories using the National Committee for Clinical Laboratory Standards extended-

spectrum beta-lactamase detection methods. J Clin Microbiol. 2001 Aug;39(8):2864-72.
8. Livermore DM, Brown DF. Detection of beta-lactamase-mediated resistance. J Antimicrob Chemother. 2001 Jul;48 Suppl 1: 59-64.
9. 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 Jul;56(Pt 7): 956-63.
10. Geha D, Uhl J, Gustaferro C, Persing D. Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical laboratory. J Clin Microbiol. 1994 Jul;32(7):1768-72.
11. Livermore D. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev. 1995 Oct; 8(4): 557-84.
12. Rasheed J, Tenover F. Detection and characterization of antimicrobial resistance genes in bacteria. In: Murray P, Baron E, Jorgensen J, editors. Manual of clinical microbiology. 8th ed. Washington D. C2003. p. 1196-212.
13. Chanawong A, M'Zali F, Heritage J, Lulitanond A, Hawkey P. 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 Dec; 48(6): 839-52.
14. Lee S, Park Y, Kim M, Lee H, Han K, Kang C, et al. Prevalence of Ambler class A and D beta-lactamases among clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa in Korea. J Antimicrob Chemother. 2005 Jul;56(1):122-7.
15. Celenza G, Pellegrini C, Caccamo M, Segatore B, Amicosante G, Perilli M. Spread of blaCTX-M-type and blaPER-2 β-lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2006 May;57(5):975-8.
16. Jiang X, Zhang Z, Li M, Zhou D, Ruan F, Lu Y. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother. 2006 Sep; 50(9):2990-5.
17. Mirsalehian A, Feyzabadi M, Akbari Nakhjavani F, Jabal Ameli F. Prevalence of extended spectrum beta lactamases among strains of pseudomonas aeruginosa isolated from burn patients. Tehran University Medical Journal (TUMJ). 2008;66(5):333-7.
18. Nathisuwan S, Burgess D, Lewis Jn. Extended-spectrum beta-lactamases: epidemiology, detection, and treatment. Pharmacotherapy. 2001 Aug;21(8):920-8.
19. Galas M, Decousser J, Breton N, Godard T, Allouch P, Pina P, et al. Nationwide study of the prevalence, characteristics, and molecular epidemiology of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in France. Antimicrob Agents Chemother. 2008 Feb; 52(2):786-9.
20. Yan J, Tsai S, Chuang C, Wu J. OXA-type beta-lactamases among extended-spectrum cephalosporin-resistant Pseudomonas aeruginosa isolates in a university hospital in southern Taiwan. J Microbiol Immunol Infect. 2006 Apr; 39(2):130-4.
21. Yu W, Chuang Y, Walther-Rasmussen J. Extended-spectrum beta-lactamases in Taiwan: epidemiology, detection, treatment and infection control. J Microbiol Immunol Infect. 2006 Aug;39(4):264-77.
22. Bert F, Branger C, Lambert-Zechovsky N. Identification of PSE and OXA beta-lactamase genes in Pseudomonas aeruginosa using PCR-restriction fragment length polymorphism. J Antimicrob Chemother. 2002 Jul;50(1):11-8.
23. Shahcheraghi F, Nikbin V, Shooraj F. PCR detection of PER &VEB &SHV and TEM - lactamases in multidrug resistant P. aeruginoasa isolated from wound infections in two hospitals of Tehran. Iranian Journal Of Medical Microbiology 2008;1(8):21-7.
24. Shahcheraghi F, Nikbin V, Feizabadi M. Prevalence of ESBLs genes among multidrug-resistant isolates of Pseudomonas aeruginosa isolated from patients in Tehran. Microb Drug Resist. 2009 Mar;15(1):37-9.
25. 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 Aug; 43(8): 4129-38.
26. Weldhagen G, Poirel L, Nordmann P. Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in Pseudomonas aeruginosa: novel developments and clinical impact. Antimicrob Agents Chemother. 2003 Aug;47(8):2385-92.