حضور ژن های blaGES-1, blaSPM-1 در سویه های کلینیکی اسینتوباکتر مقاوم به ایمی پنم جدا شده از بیمارستان های تهران

مریم عباسعلی پوربشاش[۱]، فرشته شاهچراغی[۲*]

۱.کارشناس ارشد میکروب شناسی، دانشگاه شهیدبهشتی
۲.میکروب شناس دانشیار انستیتو پاستورایران

* **نشانی برای مکاتبه:** تهران- خیابان پاستور- انستیتو پاستور ایران- بخش میکروب شناسی، تلفن و نمابر ۶۶۴۰۵۵۳۵،
shahcheraghifereshteh@yahoo.com
دریافت مقاله: آبان نود پذیرش برای چاپ: دی نود

چکیده

سابقه و هدف: *مقاومت بالای ذاتی و اکتسابی اسینتوباکتر درمان عفونتهای ناشی از آن را با مشکل مواجه کرده است. یکی از مکانیسم اصلی ایجاد مقاومت به آنتی بیوتیکهای بتالاکتامی تولید بتالاکتامازها می باشد. این مطالعه با هدف تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله های اسینتوباکتر و تحقیق پیرامون وجود ژنهای بتالاکتاماز bla_{SPM-1} و bla_{GES-1} د رایزوله های جدا شده در بیمارستانهای منتخب تهران صورت گرفت.*

روش کار: *تعداد۲۰۳ نمونه اسینتوباکتر از بیمارستانهای تهران جمع آوری گردیدکه با استفاده از تستهای بیوشیمیایی تعیین هویت گردیدند. حداقل غلظت موثر داروی ایمی پنم (MIC) برعلیه سویه های مقاوم به ایمی پنم به روش Micro broth dilution انجام گرفت. مقاومت آنتی بیوتیکی سویه ها به روش Disk Diffusion نسبت به آنتی بیوتیکهای مختلف سنجیده شد. تشخیص ژنهای مقاومت دارویی با روش PCR انجام گرفت.*

یافته ها: *از بین ۲۰۳ نمونه آزمایش شده، ۱۰۰ سویه مقاوم به ایمی پنم جدا شد. نتایج حساسیت ضد میکروبی حاکی از مقاومت چندگانه در سویه ها بود MIC.تمام نمونه ها برای ایمی پنم بیشتر از $g\mu/lm$ ۸ تعیین شد. مطابق با نتایج PCR، گسترش ژنهای مقاومت SPM-1 و GES-1 به ترتیب ۶٪ و ۲٪ بود.*

نتیجه گیری: *شیوع اسینتوباکتر مقاوم به بتالاکتامها در بین بیماران بیمارستانی در جهان رو به افزایش است که نتایج به دست آمده از این تحقیق این امر را تایید میکند. لذا شناسایی مکانیسم های مقاومت برای به کارگیری استراتژی های کنترل کارآمد در تجویز داروهای موثر گامی مهم در جلوگیری از گسترش سویه های مقاوم به شمارمی رود.*

واژگان کلیدی: *اسینتوباکتر، مقاومت آنتی بیوتیکی، SPM، GES*

مقدمه

اسینتوباکتر، کوکوباسیل گرم منفی است که از بسیاری از منابع انسانی و محیطی جدا می شود. این باکتری به پاتوژن مناطق گرمسیری و مرطوب معروف بوده است. شیوع عفونت های ناشی از آن در فصل تابستان بیشتر از فصول دیگر است. طی دهه گذشته شیوع عفونت های بیمارستانی ناشی از این باکتری در حال افزایش بوده است. یکی از دلایل اصلی که اسینتوباکتردر محیط بیمارستان زنده می ماند، مقاومت ذاتی آن به چندآنتی- بیوتیک رایج مورد استفاده در بیمارستان ها می باشد و همچنین عامل مهمتر توانایی آنها در کسب مقاومت نسبت به انتی بیوتیک های رایج موجود از طریق موتاسیون و یا کسب ماده ژنتیکی خارجی حامل ژن مقاومت از طریق conjugation یا روشهای دیگر نیز می تواند باشد (۱).با پیدایش مقاومت نسبت به آنتی -بیوتیک های مختلف کرباپنم ها(ایمی پنم، مروپنم) آخرین داروها ی انتخابی بر علیه اسینتوباکتر جدا شده از عفونت های بیمارستانی می باشند و به جرات می توان اسینتوباکتر را که به کرباپنم ها مقاوم شده باشد را High drug resistant نامید(۲). درمان عفونت های ناشی از اسینتوباکتر اغلب به دلیل مقاومت بالای این باکتری به بسیاری از آنتی بیوتیک ها از جمله کرباپنم ها (ایمی پنم و مروپنم) با مشکل مواجه شده است. ازجمله مکانسیم های ایجاد مقاومت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام تولید بتالاکتامازها می باشد، که از این میان می توان به متالوبتالاکتامازها و ESBLs از ClassA که در هیدرولیز کرباپنم ها نقش دارند اشاره کرد.

SPM از جمله مهمترین انواع متالوبتالاکتامازها در سودوموناس آئروژینوزا می باشد که باعث ایجاد مقاومت نسبت به ایمی پنم ومروپنم می شود(۳). آنزیم های وسیع الطیف GES-1 ابتدادر پاریس از ایزوله های کلبسیلا پنومونیه و متعاقب آن از ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا به دست آمدند(۳). حضور این دو ژن تاکنون در اسینتوباکتر گزارش نشده است. لذا هدف از انجام این تحقیق تعیین مقاومت و حساسیت ایزوله هایاسینتوباکتر نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف، تعیین MIC ایمی پنم و تحقیق پیرامون وجود ژن های bla_{SPM-1}و bla_{GES-1}بود.

روش کار

در فاصله ماه های فروردین ۸۷ تا خرداد۸۸، تعداد ۲۰۳ نمونه تحت عنوان اسینتوباکتراز تراشه، ترشحات گلو، ادرار، زخم و خون بیماران از ۷ بیمارستان مختلف تهران جمع آوری شد. به منظور حصول اطمینان از صحت انتخاب کلنی ها، تست های بیوشیمیایی (اکسیداز، کاتالاز، OF هوازی و بی هوازی، TSI، اندول SIM، سیمون سیترات، MR، VP، مک کانکی، لاکتوز) انجام شد. تعیین حساسیت و مقاومت آنتی بیوتیکی به روش دیسک دیفیوزن (طبق پروتکل CLSI) صورت پذیرفت. در این مطالعه، از آنتی بیوتیک های آزترونام (۳۰µg)، آمیکاسین (۳۰µg)،سفپیم (۳۰µg)، سفکسیم (۳۰µg)، سفتازیدیم (۳۰µg)، سفوتاکسیم (۳۰µg)، سفتریاکسون (۳۰µg) ، سیپروفلوکساسین (۳۰µg)، مروپنم (۱۰µg)، ایمی پنم (۱۰µg)، پیپراسیلین (۱۰۰µg)، پیپراسیلین/تازوباکتام (۱۱۰µg)، کلیستین (۱۰MCG)، پلی میکسین B(۳۰۰unit)از (MAST, Merseyside, U.K)یا (BBL, Sensi Disc, USA) استفاده گردید. از بین این ۲۰۳ نمونه اسینتوباکتر جمع آوری شده ، ۱۰۰ سویه اسینتوباکتر مقاوم به ایمی پنم جداسازی شد. به منظور تعیین حداقل غلظت آنتی بیوتیک که مانع رشد باکتری شودتست MIC ایمی پنم طبق پروتکل CLSI به روش Micro broth dilution صورت گرفت. از سویه سودوموناس آئروژینوزا #ATCC۲۷۸۵۳ جهت کنترل روش های آنتی بیوگرام و MIC استفاده شد.

جهت تشخیص فنوتیپی تولید متالوبتالاکتامازاز روش imipenem-EDAT Combined-disk test استفاده شد. سویه هایی جهت انجام این تست انتخاب شدند که دارای MIC≥ ۸µ/ml gبودند. پس از آماده سازی سوسپانسیون باکتری با کدورت ۰/۵ مک‌فارلند و تهیه پلیت های آنتی بیوگرام دیسک های آنتی بیوتیک ایمی پنم و ایمی پنم- EDTA (از EDTA، M ۰/۵ به مقدار ۷۵۰ مایکرولیتر به دیسک ایمی پنم اضافه شد) توسط پنس استریل بر روی محیط به ترتیبی قرار داده شد که دو دیسک حداقل ۲۴ میلی‌متر از هم فاصله داشت ند و از دیسک blank که EDTA با غلظت ۷۵۰ مایکرولیتر به آن اضافه شده به عنوان کنترل منفی استفاده شد . اگر تفاوت هاله ایجاده شده از دیسک ایمی- پنم با ایمی پنم –EDTA در سویه آزمایش شده به اندازه برابر یا بیش از ۱۷ میلی متر بود به عنوان سویه تولید کننده آنزیم متالوبتالاکتاماز (+)MBLدر نظر گرفته شد(۴).

برای انجام PCR و شناسایی ژن های bla_{SPM-1}و bla_{GES-1}ایزوله هایی با MIC≥ ۸µ/ml g انتخاب شدند. به منظور استخراج DNAی ایزوله ها ، سوسپانسیون غلیظی از آ ن ها در آب مقطر حاوی (۲۰µg / ml) RNase تهیه شد. سپس DNAی هر یک از ایزوله ها به روش جوشاندن (boiling) استخراج گردید. تست PCR با استفاده پرایمرها زیر و برنامه حرارتی مندرج درجدول ۱ دردستگاه ترموسایکلر (Mastercycler, Eppendorf, Hamburg, Germany) انجام گرفت(۷-۵).

5'-GCGTTTTGTTTGTTGCTC-3' , 5'- :bp۷۸۶bla_{SPM-1}(
TTGGGGATGTGAGACTAC-3')
5'-ATGCGCTTCATTCACGCAC-3' , :bp۶۷۸bla_{GES-1}(
5'-CTATTTGTCCGTGCTCAGG-3').

لازم به ذکر است که سودوموناس آئروژینوزا ۱۶ به عنوان سویه کنترل مثبت bla_{SPM-1} و کلبسیلا پنومونیه ORI-1 به عنوان کنترل مثبت bla_{GES-1}استفاده شد. همچنین ژل آگارز ۱٪ برای الکتروفورز محصولات PCR و نیز مارکر(Lithuania)Fermentase ۱۰۰bp Ladder ، مورد استفاده قرار گرفت.

جدول ۱: شرایط انجام PCR ژن های SPM و GES

no	Factor Gene Step	Temp. (C°) SPM/GES	Time(min) SPM/GES
۱	Initial denaturation	۹۴	۲/۱۰
۲	Denaturation	۹۴	۱/۵
۳	Annealing	۵۵	۱
۴	Extension	۷۲	۱
۵	Final extension	۷۲	۱:۳۰
۶	Cycle number	۴۰	

یافته ها

از ۱۰۰ ایزوله اسینتوباکتر جمع آوری شده به روش های بیوشیمیایی، ٪۴۷ (۴۷ نمونه) از نمونه های خون، ٪ ۷ نمونه های ادرار(۷نمونه)، ٪۱۲ (۱۲ نمونه) از نمونه های زخم، ٪ ۱۰نمونه های خلط(۱۰ نمونه) و ٪۲۴ از تراشه (۲۴نمونه) جداسازی شد. بیشترین میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک سفکسیم، مروپنم، سفتریاکسون و سفوتاکسیم بود و در رده بعدی آنتی‌بیوتیک‌های پیپراسیلین و آزترونام قرار داشتند . در مقابل کمترین مقاومت به آنتی بیوتیک های کلیستین و پلی میکسین B مشاهده شد. میزان مقاومت به آنتی بیوتیک های مورد مطالعه به شرح ذیل بود:
آمیکاسین ۸۴٪، آزترونام ۹۶٪، سیپروفلوکساسین ۸۲٪، سفتریاکسون ۹۹٪، سفوتاکسیم ۹۸٪، سفتازیدیم ۸۶٪ سفکسیم ۱۰۰٪، سفپیم ۹۰٪، مروپنم ۱۰۰٪، پیپراسیلین ۹۶٪، پیپراسیلین/تازوباکتام ۹۵٪، پلی میکسین B ۳٪ و کلیستین ۱۲٪ . هشتاد سویه از ۱۰۰ سویه، MDR بودند، یعنی به سه خانواده آنتی بیوتیکی سفالوسپورین ها و کرباپنم ها و کوئینولون ها همزمان مقاومت نشان دادند.در تست MIC از میان ۱۰۰ سویهٔ جدا شده، ۲۸٪سویه ها دارای MIC≥۱۲۸µg/ml، ۴۷٪سویه هاMIC =۶۴µg/ml، ۱۸٪ سویه ها دارای MIC= ۳۲µg/ml، ۳٪ سویه هاMIC= ۱۶ µg/ml، ۴٪ سویه ها MIC= ۸ µg/ml بودند. با توجه به مقادیر ذکر شده اکثر سویه های جداسازی شده دارای MIC= ۶۴ µg/ml بودند.

پس از انجام تست فنوتیپی تأئیدی Combined disk ، ۹٪از سویه های مقاوم به ایمی پنم مولد MBL (متالوبتالاکتاماز) بودند.پس از بهینه سازی و انجام آزمون PCR بر روی سویه های فوق، محصول PCR ژن SPM-1 با وزن مولکولی ۷۸۶ جفت باز و محصول PCR ژن GES-1 با وزن مولکولی ۶۷۸جفت باز حاصل گردید. شش سویه دارای ژن مقاومت SPMبودند و ۲ سویه دارای ژن GES-1که مشخصات این سویه ها در جدول ۲آمده است. توالی هر کدام از باندهای DNA با استفاده از نرم افزار Chromas مشاهده گردید.پس از پردازش توالی ها، توالی هر کدام از باندهای ۷۸۶bpو ۶۷۸ bpدر GenBank به ترتیب با accession number های HM370523،HM370522 گزارش گردید.

جدول۲ : مشخصات نمونه های حامل ژن GES, SPM

شماره سویه	مقاومت آنتی بیوتیکی															PCR	
	ATM	CRO	CPM	AN	CAZ	CIP	CTX	PRL	MEM	IMP	CFM	PTZ	CL	POLY	MIC_{IMP}µg/ml	GES	SPM
۳۰	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	۱۲۸≥	-	+
۴۱	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	۶۴	-	+
۴۳	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	۶۴	+	+
۵۱	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	۴	+	+
۵۸	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	۶۴	-	+
۷۰	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	۶۴	-	+

POLy: پلی میکسین، CL: کلیستین، PTZ: پیپراسیلین/تازوباکتام، CFM: سفکسیم، IMP: ایمی پنم، MEM: مروپنم، PRL: پیپراسیلین،CTX: سفوتاکسیم، CIP: سیپروفلوکساسین، CAZ: سفتازیدیم، AN: آمیکاسین، CPM: سفپیم، CRO: سفتریاکسون، ATM: آزترونام.

بحث

در این تحقیق مشاهده می شود که سوشهای بالینی اسینتوباکتر مقاومت بالایی که در برابر سفالوسپورین‌های نسل سوم دارند، مقاومت ۱۰۰٪ در سفکسیم، ۹۸٪ در سفوتاکسیم و ۸۶٪ در سفتازیدیم، نشان دهنده این موضوع است که سفالوسپورین‌های نسل سوم داروی مناسبی برای درمان این نوع عفونتها نمی‌باشند . بدیهی است که اصرار بر تجویز بدون توجه به مقاومت بالای سوشهای اسینتوباکتر ، درمان مؤثری را در بر ندارد. در مقایسه مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های مورد مطالعه، سوش های مورد بررسی مقاومت پایینی نسبت به پلی میکسین ها نشان دادند. از این رو پلی میکسین ها برای درمان عفونت های ناشی از اسینتوباکتربسیار مناسب به نظر می رسند. دلیل احتمالی حساس بودن نسبت به این آنتی بیوتیک ها، تجویز کم این آنتی بیوتیک به بیماران در دوره اخیر بوده است.

در مطالعه صورت گرفته ایزوله هایی MDR نامیده شدند که به سه دسته آنتی بیوتیکی شامل:سفالوسپورین ها(سفپیم و سفتازیدیم)،کرباپنم ها (ایمی پنم و مروپنم) و کینولون ها (سیپروفلوکسازین) مقاوم بودند(۲). که از ۱۰۰سویه اسینتوباکتر مقاوم به ایمی پنم مطالعه شده در این تحقیق ۸۰ سویه MDR بودند. چنین حالتی حاکی از استفاده بی رویه از رژیم دارویی نامناسب برای درمان عفونت های ناشی از اسینتوباکتر در بیمارستان های مورد مطالعه است که موجب افزایش فشار طبیعی حاصل از مصرف بی رویه آنتی بیوتیک و متعاقبا افزایش سطح مقاومت به آنتی بیوتیک های مذکور شده است (۲).درصد سویه های مقاوم به ایمی پنم در سال ۲۰۰۷ از سنگاپور ۹۵/۲٪، کره ۸۷٪، تایوان ۶۲/۵٪، تایلند ۵۹/۲٪، چین ۵۰٪ و در ایران ۴۹/۳٪ گزارش شده است. همچنین در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۸ در آنکارا صورت گرفته مقاومت سویه ها به ایمی پنم ۸۰/۳٪ گزارش شده است. در تحقیق صورت گرفته ۴۹/۳٪ سویه های جمع آوری شده به ایمی پنم مقاوم بودند یعنی نسبت به سال ۲۰۰۷ که ۴۹/۳٪ سویه ها مقاوم گزارش شده است، افزایش مقاومتی صورت نگرفته است(۸و ۹).در این مطالعه براساس نتایج MIC، ۴٪ سویه ها دارای مقاومت حد واسط MIC=۸µg/ml و بقیه سویه ها مقاومت بالای ایمی پنم MIC=۱۶µg/ml را از خود نشان دادند. در تحقیق صورت گرفته در یونان در سال ۲۰۰۷، ۶۱ سویه MIC=۱۶µg/ml و ۱۱ سویه MIC=۸µg/ml مقاومت حد وسط را نسبت به ایمی پنم نشان دادند (۱۰).

در این مطالعه جهت غربالگری سویه های تولیدکننده متالوبتالاکتاماز با استفاده از روش Combined disk مشخص گردید ۹٪ سویه های مقاوم به ایمی پنم، تولیدکننده متالوبتالاکتاماز می باشند. نتایج حاضر با مطالعه صورت گرفته توسط Young et al. که درصد سویه های تولیدکننده در کره را ۵۰٪ گزارش کرده اندو همچنین مطالعه صورت گرفته در پاکستان توسط Irfan و همکارانش در ۲۰۰۱ که ۹۶/۶٪ سویه ها تولیدکننده متالوبتالاکتاماز بودند، متفاوت است. علت این امر می تواند استفاده از روش متفاوت و تفاوت در میزان مقاومت در سایر نقاط جهان باشد (۱۱).

برای بررسی وجود ژن های مولد آنزیم های مورد مطالعه از فناوری PCR و پرایمرهای اختصاصی برای تشخیص ژن bla_{GES-1}وbla_{SPM-1} استفاده شد. که از بین ۱۰۰ نمونه اسینتوباکتر مقاوم به ایمی پنم بررسی شده فقط ۶سویه از لحاظ تولید bla_{SPM-1} مثبت بودند و ۲ سویه از این ۶ سویه دارای ژن bla_{GES-1} بودند. ژن SPM-1 برای اولین در برزیل در سال ۱۹۹۷ از سودوموناس جدا شده از خون کودک مبتلا به سرطان خون جداسازی شد. در تحقیق صورت گرفته در برزیل مشاهده شد تولید متالوبتالاکتاماز SPM-1بیشترین مکانیسم مقاومت در بین سویه های سودوموناس را به خود اختصاص داده است و باعث هیدرولیز آنتی بیوتیک های بتالاکتام و ایجاد مقاومت بالایی نسبت سفتازیدیم و ایمی پنم می شود(۱۲). تشخیص GES- 1درمیان گونه های ایرانی اسینتوباکتر ازیافته های مهم مطالعه حاضرمی باشد.GES- 1در تقسیم بندی امبلر به Class Aتعلق دارد که بر روی پلاسمید واقع شده و در خانواده انتروباکتریاسه شناسایی شد. این آنزیم وسیع الطیف در ابتداازسویه کلبسیلاپنومونیه در سال ۱۹۹۸گزارش شد. با این حال ، GES-1ممکن است به عنوان آنزیم هیدرولیزکننده سفتازیدیم نیز طبقه بندی شود. تا کنون سویه اسینتوباکتر که حضور ژن های SMP-1وGES-1در آن شناسایی شده باشد گزارش نگردیده و این مطالعه اولین گزارش از حضور این ژن ها در اسینتوباکتر می باشد (۳).

نکته دیگر اینکه، همه این ۶ سویه به تمامی آنتی بیوتیک های مورد مطالعه به غیر از پلی میکسین B و کلیستین مقاوم هستند و دارای $MIC_{IMP} \geq 64 \mu g/ml$ هستند. ۲ سویه از این ۶ سویه علاوه بر ژن SPM دارای ژن GES-1 هستند که این وضعیت نگران کننده است.تمامی سویه های SPM(+) جداسازی شده، در روش فنوتیپی منفی بودند و ۹ سویه که با روش فنوتیپی تولید کننده متالوبتالاکتاماز بودند با روش PCR منفی بودند. در مورد اول شاید روش فنوتیپی به کار گرفته شده حساسیت کافی ندارد. در تایید این موضوع در تحقیقی که در سال ۲۰۰۲ توسط Lee et al. صورت گرفته بود، که از ۸۰ سویه اسینتوباکتر که به روش PCR حضور ژن متالوبتالاکتاماز در آن ها تایید شده بود، تنها ۵٪ سویه ها در تست تشخیص فنوتیپی تولید متالوبتالاکتاماز به روش Double Disk Synergy test، MBL منفی شدند. در مورد دوم نیز شاید باکتری ها دارای ژن هایی به غیر از SPM هستند و یا از مکانیسم های مقاومت دیگری استفاده می کنند (۱۳).

نتیجه گیری

به دلیل مقاومت بالای اسینتوباکتر و انتشار آسان و حضور همه جایی آن و همچنین قابلیت انتقال ژنهای مقاومت از طریق عوامل ژنتیکی متحرک مانند پلاسمیدهای کانژوکاتیو و اینتگرون ها در بین باکتری های مهم بیمارستان، باید روشهای کنترل مؤثر را در زمینه ضدعفونی بیمارستان و رعایت نکات بهداشتی توسط بیماران و پرسنل بیمارستان از یک سو و کاهش مصرف بی رویه آنتی بیوتیک های وسیع الطیف از سوی دیگر به کار برد و از آنجایی که سویه های حامل ژن های SPM و GES در این مطالعه پایین بودند احتمالا فاکتورهای دیگری مانند تولید بتالاکتامازهای وسیع الطیف، کرباپنمازها، تغییرات کمی و کیفی در پورین های غشای خارجی و تغییر در پروتئین های اتصالی به پنی سیلین ها نیز در ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های مطالعه نقش دارند.

تشکر و قدردانی

از زحمات خانم وجیهه نیک بین و خانم فهیمه شورج که ما را در انجام این تحقیق یاری نموده اند کمال تشکر را داریم.

REFERENCES

1.Towner K, Bergogne-Bérézin E, Fewson CA.The Biology of Acinetobacter: Taxonomy, Clinical Importance, Molecular, Biology, Physiology, Industrial Relevance. Federation of European Microbiological Societies. FEMS symposium; No.57. New York: Plenum Press; 1991: 451.

2.Perez f, Hujer AM, Hujer KM, Decker B K, Rather P N, Bonomo RA. The Global Challeng of Multidrug Resistant (MDR) Acinetobacter baumannii. AntimicrobAgents Chemother.2007 Oct; 51(10): 3471-84.

3.Shahcheraghi F, Nasiri S. Beta-lactamases and microbial resistance. 1st. ed. Teharan: KHosravi Press; 2009:70-88.(Text in Persian)

4.Yong D, Lee K, Yum JH, Shin HB. Imipenem_EDTA disk method for differentiation of Metallo-β-lactamase-producing clinical isolates of Pseudomonas spp.And Acinetobacter spp. J of Clin Microbiol. 2002 Oct; 40(10): 3798-3801.

5.ShibataN, Doi Y, Yamane K, Yagi T, Kurokawa H, Shibayama K, Kato H. PCR typing of genetic determinants for Metallo-β-Lactamases and Integrases carried gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. J of Clin Microbiol.2003 Dec; 41(12): 5407-13.

6.WeldhagenGF, Poirel L, Nordman P. (2003). Ambler class A extended-spectrum β-lactamase in Pseudomonas aeruginosa: novel developments and clinical impact. Antimicrob Agents and Chemother. 2003 Aug; 47(8): 2385-92.

7.Poire L, weldhagen GF, Naas T, De champs CH, Dove MG, Normann P. GES-2, a class A beta-lactamase from Pseudomonas aeryginosa with increased hydrolysis of imipenem. Antimicrob Agents and Chemother 2001 Sep; 45(9): 2598-2603.

8.Rodrigo E, Mendes J. Emergence and widespread dissemination of OXA-23,-24/40 and -58 Carbapenem among Acinetobacter spp. In Asia-Pacific nation: report from the SENTRY Surveillance Progarm.J AntimicrobChemother.2008 Sep; 63(1): 55-9.

9.Feizabadi MM, FathollahzadehB,Taherilhan M, Rasoolinejad M,SadeghifardN,Aligholi M. Antimicrobial susceptibility patterns and distribiution of blaOXA genes among Acinetobacter spp. Isolated from patients at Tehran hospital. Jpn. J. Infect. Dis.2005 Jul; 61(4); 274-8.

10.IkonomidisA, Ntokou E, Maniatis AN, Tsakris A, Pournaras S. Hidden VIM-1 metallo-β-lactamase phenotypes among Acinetobacterbaumannii clinical isolates.J. of ClinMicrobiol.2008 Jan; 46(1): 346-9.

11. Irfan S, Zafar A, Guhar D, Ahsan T, Hasan R. Metallo-β-lactamase-producing clinical isolates of Acinetobacter species and Pseudomonas aeruginosa from intensive care unit patients of a tertiary care hospital. Indian J of Med Microbiol. 2008 Jul-Sep; 26(3): 243-45.

12.CorbellaX, Montero A, Pujol M. Emergence and rapid spread of carbapenem resistance during a large and sustained hospital outbreak of multiresistant Acinetobacter baumannii.J ClinMicrobiol. 2000 Nov; 38(11): 4086-95.

13.Kilic A, Li H, Mellmann A, basustaoglu A C, Kul M, Senses Z, Aydogan H. Acinetobactersepticus sp. Nov. Association with a nosocomial outbreak of bacteremia in a neonatal intensive care unit.J of ClinMicrobiol. 2008 Mar; 46(3): 902-8.