

FARKLI DİRENÇ FENOTİPLERDEKİ PSEUDOMONAS AERUGINOSA İZOLATLARININ AmpC BETA-LAKTAMAZ EKSPRESYON DÜZEYLERİ

Hüseyin Agah TERZİ¹, Canan KÜLAH², İhsan Hakkı ÇİFTÇİ¹

¹Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, SAKARYA

²Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü, ZONGULDAK

ÖZET

Pseudomonas aeruginosa üyelerinde Enterobacteriaceae ailesinin çeşitli türlerinde bulunan kromozomal kaynaklı AmpC'ye benzer indüklenilebilen bir AmpC sefalosporinaz bulunduğu bilinmektedir. AmpC üretimi anlamlı derecede arttığında, *P.aeruginosa* karbapenemler hariç bütün β -laktamlara direnç geliştirir. Bu çalışmada farklı direnç fenotiplerindeki *P.aeruginosa* izolatlarının AmpC ekspresyon düzeyleri ve AmpC β -laktamaz enziminin dirence etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmaya dahil edilen 49 *P.aeruginosa* klinik izolatının antibiyotik duyarlılık testleri disk difüzyon yöntemi ile yapılmış ve CLSI önerileri doğrultusunda değerlendirilmiştir. Minimal inhibitör konsantrasyonları otomatize VITEK 2 sistemi (bioMérieux, Fransa) kullanılarak belirlenmiştir. İzolatlar dört farklı gruba ayrılmıştır: 1. Grup, çoklu ilaç dirençli (ÇİD) (seftazidim ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$, piperasilin ≥ 128 $\mu\text{g/ml}$, imipenem ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$ ve gentamisin ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$); 2. Grup, izole karbapenem dirençli (İKR) (imipenem ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$); 3. Grup, hem karbapenem hem de kinolon dirençli (imipenem ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$, siprofloksasin ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$) ve 4. Grup, izole kinolon dirençli (siprofloksasin ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$) izolatlar. AmpC bölgesinin transkripsiyon ürün seviyesi gerçek zamanlı polimerize zincir reaksiyonu (qPCR) yöntemiyle LightCycler cihazı (Roche, Almanya) kullanılarak belirlenmiştir.

Çalışmamızda incelenen 49 *P. aeruginosa* klinik izolatının 23'ünde (% 47) AmpC aşırı ekspresyonu tespit edilmiştir. Grup 1, 2, 3 ve 4 için ortalama ekspresyon değerleri sırasıyla 3717.66 $\pm$ 4344.20, 6.96 $\pm$ 13.52, 1.26 $\pm$ 1.31 ve 0.54 $\pm$ 0.30 olarak belirlenmiştir. Aşırı ekspresyon gösteren suşların 21'i (% 91) ÇİD izolatları içeren birinci grupta görülmüş ve diğer gruplarla karşılaştırıldığında birinci grubun istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği saptanmıştır ($p=0.001$). İKR izolatların ikisinde (% 22) aşırı ekspresyon tespit edilmiştir. Üçüncü ve 4. grupta ise AmpC aşırı üretimi görülmemiştir.

AmpC aşırı üretimi *P. aeruginosa*'nın karbapenem direncine tek başına etki etmemekte, ilave direnç mekanizmaları birlikteliğinde dirence katkı sağlayabilmektedir. ÇİD ve İKR izolatlarının AmpC ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında; β -laktamaza daha dirençli gibi görünen karbapenemlerin antipseudomonal olarak kullanımı önerilebilir. Ayrıca kinolon dirençli 3. ve 4. grupta AmpC aşırı üretimi saptanmış olması AmpC β -laktamazın kinolon direnci üzerine etkisiz olduğunu düşündürmektedir. AmpC β -laktamaz direnci ile mücadelede yeni tedavi stratejileri geliştirilmeli ve AmpC gen bölgesinin ekspresyonunu düzenleyen mekanizmaların açıklanmasına yönelik moleküler çalışmalar planlanmalıdır.

Anahtar sözcükler: AmpC β -laktamaz aşırı üretimi, AmpC ekspresyonu, qPCR, *P.aeruginosa*

SUMMARY

AmpC Beta-Lactamase Expression Levels of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates with Different Resistance Phenotypes

Pseudomonas aeruginosa carries an inducible AmpC cephalosporinase that is similar to the chromosomally encoded AmpC found in several members of Enterobacteriaceae. When AmpC production is significantly increased, *P. aeruginosa* develops resistance to all β -lactams excluding carbapenems. In this study, we investigated the expression level of AmpC and the effect of the AmpC β -lactamase enzyme on resistance among clinical isolates of *P.aeruginosa* with different resistance phenotypes.

The antibiotic sensitivity tests of 49 clinical isolates of *P. aeruginosa* included in this study were carried out using the disk diffusion method and evaluated in terms of the CLSI recommendations. VITEK 2 automated system (bioMérieux, France) was used to determine the minimum inhibitory concentrations. Four different types of *P. aeruginosa* isolates were included in the study: Group 1, multidrug-resistant (MDR) isolates (ceftazidime ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$, piperacillin ≥ 128 $\mu\text{g/ml}$, imipenem ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$, and gentamicin ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$); Group 2, one carbapenem-resistant (ICR) one (imipenem ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$); Group 3, carbapenem- and quinolone-resistant isolates (imipenem ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$, ciprofloxacin ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$); and Group 4, one quinolone-resistant isolates (ciprofloxacin ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$). The transcription product level of AmpC was detected by real-time polymerase chain reaction (qPCR) using a LightCycler instrument (Roche Diagnostics, Germany).

Among the 49 clinical *P. aeruginosa* isolates in our study, AmpC overexpression was detected in 23 (47 %) isolates. The mean expression values in Groups 1, 2, 3, and 4 were 3717.66 $\pm$ 4344.20, 6.96 $\pm$ 13.52, 1.26 $\pm$ 1.31, and 0.54 $\pm$ 0.30, respectively. Twenty-one of 23 overexpressed isolates was detected in Group 1, showing a statistically significant difference from the other groups ($p = 0.001$). Overexpression was detected in two of the nine ICR isolates (22 %). We did not determine AmpC overexpression in Groups 3 and 4.

AmpC overproduction alone does not significantly alter the susceptibility of *P.aeruginosa* to carbapenems, but could certainly contribute to resistance if accompanied by additional resistance mechanisms. Comparison of AmpC expression levels between the MDR and ICR isolates indicated that carbapenems seem to be more resistant to β -lactamases and may show potential as an antipseudomonal β -lactam agent. In addition, the lack of AmpC overexpression in the quinolone-resistant isolates of Groups 3 and 4 suggests ineffectiveness of AmpC β -lactamase toward quinolone resistance. New therapeutic strategies must be developed against AmpC β -lactamase resistance, and molecular studies should be planned to elucidate the mechanisms that regulate expression of the AmpC gene.

Keywords: AmpC β -lactamase overproduction, AmpC expression, qPCR, *P.aeruginosa*

İletişim adresi: Hüseyin Agah Terzi. Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, SAKARYA
GSM: (0536) 462 86 54

e-posta: agah.terzi@yahoo.com

Alındığı tarih: 25.06.2014, Yayına kabul: 02.10.2014

GİRİŞ

Pseudomonas aeruginosa kaynaklı infeksiyonların tedavisinde antibiyotik direnci her geçen gün önemi artan bir konu olup β -laktam antibiyotiklere kazanılmış dirençle ilişkili enzim yapım mekanizmaları dikkat çekicidir^(10,14). *P.aeruginosa* üyelerinde *Enterobacteriaceae* ailesinin çeşitli türlerinde bulunan kromozomal kaynaklı AmpC benzeri indüklenebilen bir AmpC sefalosporinaz bulunduğu bilinmektedir. Ancak *P.aeruginosa* sokak suşları bazal seviyede AmpC üretirler ve antipseudomonal penisilinlere, penisilin inhibitör kombinasyonlarına, sefalosporinlere ve karbapenemlere duyarlıdırlar. AmpC üretimi anlamlı derecede arttığında, *P.aeruginosa* karbapenemler hariç bütün β -laktamlara direnç geliştirir^(4,6,13).

Bu çalışmada farklı direnç fenotiplerindeki *P.aeruginosa* izolatlarının AmpC ekspresyon düzeyleri ve AmpC β -laktamaz enziminin direnç etkisinin moleküler yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

İzolatların Seçimi

Çalışmaya tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarına Kasım 2010 ve Kasım 2011 tarihleri arasında rutin olarak gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen *P.aeruginosa* suşları dahil edilmiştir. Elde edilen tüm izolatların antibiyotik duyarlılık testleri Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile yapılmış ve Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) önerileri doğrultusunda değerlendirilmiştir⁽³⁾. *P.aeruginosa* izolatlarından çoklu ilaç dirençli (ÇİD), izole karbapenem dirençli, izole kinolon dirençli ve yalnız karbapenem ve kinolon dirençli olan 49 izolat ile 4 farklı grup oluşturulmuştur.

Çalışmaya dahil edilen izolatlardaki indüklenebilir β -laktamaz (İBL) üretimi disk yaklaşım yöntemiyle tespit edilmiştir.

Minimal İnhibitor Konsantrasyonun (MİK) Belirlenmesi

Elde edilen 49 izolatın seftazidim, gentamisin, piperasilin, siprofloksasin, imipenem ve

meropenem için MİK değerleri otomatize VITEK 2 sistemi (bioMerieux, Fransa) kullanılarak belirlenmiştir. MİK direnç değerleri CLSI önerileri doğrultusunda, seftazidim, gentamisin, piperasilin, siprofloksasin, imipenem ve meropenem için sırasıyla; ≥ 32 , ≥ 16 , ≥ 128 , ≥ 4 , ≥ 16 ve ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$ kabul edilmiştir⁽³⁾.

Quantitative RT-PCR (qPCR)

Çalışmaya dahil edilen örneklerin RNA izolasyonu High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Almanya) kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen RNA'dan (100 ng/ μl) Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche, Almanya) kullanılarak cDNA sentezi yapılmıştır. Gerçek zamanlı polimerize zincir reaksiyonu (qPCR) yöntemiyle LightCycler cihazı (Roche, Almanya) kullanılarak AmpC gen bölgesinin transkripsiyon ürün düzeyleri belirlenmiştir.

PCR çalışmasında kullanılan "AmpC-Forward CTGTTTCGAGATCGGCTC", "AmpC-Reverse CCGTATAGGTGCGCTC", "rpsL-Forward GCTGCAAACTGCCCCGAACG" ve "rpsL-Reverse ACCCGAGGTGTCCACGCTTGG" primer dizileri National Center for Biotechnology Information (NCBI) BLAST programı kullanılarak (www.ncbi.nlm.gov/BLAST) elde edilmiştir. Kontrol çalışmalarında kullanılacak olan cDNA *P.aeruginosa* PAO1 suşundan elde edilmiştir.

Gen Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

İncelenen genlerin ekspresyonlarının analizi için yazılım (LightCycler® Relative Quantification Software) kullanılarak göreceli (delta-delta Ct) kantitatif değerler oluşturulmuştur⁽¹¹⁾.

Gen transkripsiyon düzeylerini değerlendirmede PAO1 standart suşunun ribozomal proteinini kodlayan rpsL geni referans olarak kullanılmıştır. AmpC için PAO1 ile karşılaştırıldığında izolatların mRNA düzeyinde 10 katlık artış bu genlerdeki aşırı ekspresyon olarak, beş katın altındaki artış ise aşırı ekspresyon olmadığı şeklinde yorumlanmıştır. Beş-on kat arası artışta ise sınırda ekspresyon olarak kabul edilmiştir⁽²⁾.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirme SPSS 17.0 programı kullanılarak yapılmıştır. Gruplar arasında-

ki istatistiksel farkın belirlenmesinde One Way ANOVA testi kullanılmıştır.

BULGULAR

İzolatlar ve Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları

Çalışmaya dahil edilen 49 izolat antibiyotik duyarlılık profilleri doğrultusunda dört gruba ayrılmıştır. Antibiyogram sonuçları ile ilişkili ayrıntılı veriler Tablo 1’de özetlenmiştir.

Birinci gruptaki izolatlarda seftazidim, piperasilin, imipenem ve gentamisin; ikinci gruptaki izolatlarda imipenem; üçüncü gruptaki izolatlarda imipenem ve siprofloksasin; dördüncü gruptaki izolatlarda ise siprofloksasin MİK değeri sınır değerlerin üzerinde tespit edilmiştir.

Gen ekspresyonu

AmpC aşırı ekspresyonu; 49 klinik *P.aeruginosa* izolatının 23’ünde belirlenmiştir. Bir izolatta AmpC miktarı tespit edilememiştir. Referans suş ile karşılaştırıldığında 25 izolatta ise aşırı ekspresyon görülmemiştir. Birinci gruptaki çoklu ilaç dirençli 21 izolatın tümünde AmpC aşırı ekspresyonu belirlenmiştir. İkinci gruptaki izole karbapenem dirençli dokuz izolattan sadece ikisinde AmpC aşırı ekspresyonu belirlenmiştir. Üçüncü gruptaki karbapenem ve kinolon dirençli yedi izolat ve dördüncü gruptaki izole kinolon dirençli oniki izolatta aşırı ekspresyon

görülmemiştir.

Çalışmamızda AmpC görülme sıklığı % 47 olarak belirlenmiş, göreceli mRNA ekspresyon seviyelerinin gruplar arasındaki istatistiksel verileri Tablo 2’de gösterilmiştir. Birinci grupta saptanan aşırı ekspresyon nedeniyle gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0.001$).

Tablo 2. AmpC ekspresyon düzeylerinin bütün izolatlar arasındaki istatistik verileri.

	1. Grup	2. Grup	3. Grup	4. Grup
Ortalama Değer	3717,66	6.96	1.26	0.54
Minimum Değer	10	0	0.22	0.1
Maksimum Değer	15245	41	4	1.06
Standart sapma	4344,2	13.52	1.31	0.3

TARTIŞMA

Antibiyotik direnci ile ilişkili bir enzim olan AmpC β -laktamazın *P.aeruginosa*’daki aşırı üretiminin klinik etkilerini değerlendirmek çoklu direnç mekanizmaları ve bunların kompleks etkileşimi dolayısıyla zordur. Tam ve ark.⁽¹⁵⁾ *P.aeruginosa* bakteriyemisi olan hastaları suşların AmpC üretimine göre iki gruba ayırarak incelemiş; AmpC aşırı üretimi olan suşlarla infekte hastalarda yanlış antibiyotik kullanımının aşırı AmpC üretimi olmayan suşlarla infekte hastalara göre belirgin olarak yüksek bulunmuşlardır. Ek olarak bu çalışmadaki AmpC aşırı üretimi

Tablo 1. Çalışmaya alınan izolatların antibiyotik duyarlılıkları [n(%)].

	Toplam (n=49)			Grup 1 (n=21)			Grup 2 (n=9)			Grup 3 (n=7)			Grup 4 (n=12)		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
IPM (10 µg)	12 (24)	0	37 (76)	0	0	21 (100)	0	0	9 (100)	0	0	7 (100)	12 (100)	0	0
MEM (10 µg)	15 (31)	6 (12)	28 (57)	0	0	21 (100)	3 (33)	3 (33)	3 (33)	0	3 (43)	4 (57)	12 (100)	0	0
CAZ (30 µg)	28 (57)	0	21 (43)	0	0	21 (100)	9 (100)	0	0	7 (100)	0	0	12 (100)	0	0
FEP (30 µg)	28 (57)	8 (16)	13 (27)	0	8 (38)	13 (62)	9 (100)	0	0	7 (100)	0	0	12 (100)	0	0
PIP (100 µg)	29 (59)	0	20 (41)	0	0	21 (100)	9 (100)	0	0	7 (100)	0	0	12 (100)	0	0
TZP (100/10 µg)	40 (82)	0	9 (18)	12 (57)	0	9 (43)	9 (100)	0	0	7 (100)	0	0	12 (100)	0	0
ATM (30 µg)	27 (55)	1 (2)	21 (43)	0	0	21 (100)	9 (100)	0	0	7 (100)	0	0	12 (100)	0	0
CIP (5 µg)	9 (18)	3 (6)	37 (76)	0	0	21 (100)	9 (100)	0	0	0	3 (43)	4 (57)	0	0	12 (100)
LEV (5 µg)	9 (18)	0	40 (82)	0	0	21 (100)	9 (100)	0	0	0	0	7 (100)	0	0	12 (100)
AK (30 µg)	38 (78)	4 (8)	7 (14)	10 (48)	4 (19)	7 (33)	9 (100)	0	0	7 (100)	0	0	12 (100)	0	0
CN (10 µg)	28 (57)	0	21 (43)	0	0	21 (100)	9 (100)	0	0	7 (100)	0	0	12 (100)	0	0
TOB (10 µg)	28 (57)	0	21 (43)	0	0	21 (100)	9 (100)	0	0	7 (100)	0	0	12 (100)	0	0

S: Duyarlı, I: Orta Duyarlı, R: Dirençli

Grup 1: Çoklu ilaca dirençli *P.aeruginosa* klinik izolatları

Grup 2: İzole karbapenem dirençli *P.aeruginosa* izolatları

Grup 3: İzole karbapenem ve kinolon dirençli *P.aeruginosa* izolatları

Grup 4: İzole kinolon dirençli *P.aeruginosa* izolatları

olan suşlarla infekte hastalarda çoğu kez persistan bakteriyemi (% 45'e karşılık % 6) olması, AmpC aşırı üreten *P.aeruginosa* izolatlarının hızlı identifikasyonunun ve AmpC aşırı üretim mekanizmalarıyla ilgili çalışmaların gerekliliği ortaya koymuştur.

Çalışmamızda incelenen 49 *P.aeruginosa* klinik izolatının 23'ünde (% 47) AmpC aşırı ekspresyonu tespit edilmiştir. Aşırı ekspresyon gösteren suşların 21'i (% 91) literatürle uyumlu olarak çoklu ilaca dirençli izolatları içeren birinci grupta görülmüş ve diğer gruplarla karşılaştırıldığında birinci grubun istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği saptanmıştır ($p=0.001$).

Çalışmamızda irdelenen izole karbapenem dirençli grupta literatürle uyumlu olarak iki izolatta (2/9) (% 22) aşırı ekspresyon tespit edilmiştir. Karbapenem dirençli suşlarda AmpC aşırı üretiminin, karbapenem duyarlı suşlara göre daha sık olduğunu ileri süren bir çalışmada, karbapenemlere dirençte AmpC aşırı üretiminin yeterli olmadığı, aynı zamanda AmpC aşırı üretimine gerek de olmadığı sonucuna varılmıştır⁽⁵⁾. AmpC aşırı üretimi çoğu β -laktama direnç gelişimi ile sonuçlanırken *P.aeruginosa*'daki AmpC ile karbapenem duyarlılığı arasındaki ilişki tam olarak anlaşılamamıştır⁽⁸⁾. *P.aeruginosa*'nın izojenik mutantlarının kullanıldığı bir çalışmada mutantların AmpC'yi kaybetmesinden sonra imipenem ve panipenem duyarlılığında (meropenem hariç) dört katın üzerinde anlamlı bir artış gözlenmiştir⁽⁹⁾. Bu veriler *P.aeruginosa*'nın karbapenem duyarlılığı ile AmpC'nin ekspresyon faktörleri arasında bir ilişki olabileceğini düşündürmektedir.

P.aeruginosa'ya bağlı gelişen infeksiyonların kombinasyon tedavisinde beta-laktam ve florokinolon kombinasyonu kullanımı son yıllarda giderek artmaktadır. Yapılan çalışmalarda florakinolonlar ile beta-laktam antibiyotiklerin kombinasyonu deneysel pnömoni modellerinde sinerjik olarak bulunmuştur^(1,7). Yalnız seftazidime ve seftazidim-siprofloksasin kombinasyonuna direnç gelişimindeki mekanizmaların araştırıldığı bir çalışmada, in vitro veya in vivo olarak seçilen tüm seftazidim dirençli suşlardaki dirençten AmpC aşırı üretimi sorumlu tutulurken, seftazidim-siprofloksasin dirençli suşlarda-

ki siprofloksasin direnci, suşlarda tespit edilen *gyrA-gyrB* mutasyonları ve *mexCD-oprJ* atım pompasına bağlanmıştır⁽¹²⁾. Çalışmamızda incelediğimiz suşlar arasında yalnız karbapenem ve kinolon dirençli izolatların bulunduğu üçüncü grup ve izole kinolon dirençli izolatların bulunduğu dördüncü grupta literatürle uyumlu olarak AmpC aşırı üretimi görülmemiştir. Bu iki grupta AmpC aşırı üretimi saptanmamış olması en önemli direnç mekanizmalarından olan AmpC β -laktamazın kinolon direncinde etkisi olmadığını düşündürmektedir.

Çalışmamızda incelediğimiz AmpC gen bölgesinin *P.aeruginosa*'nın direnç mekanizmalarında önemli rol oynadığı kabul edilmektedir. Bu yüzden AmpC β -laktamaz direnci ile mücadelede yeni tedavi stratejileri geliştirilmeli ve AmpC gen bölgesinin ekspresyonunu düzenleyen mekanizmaların açıklanmasına yönelik moleküler çalışmalar planlanmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Akalın H. Pseudomonas aeruginosa infeksiyonları ve tedavisi, *Klinik Derg* 2007;20(Suppl 1):208-14.
2. Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Tubau F et al. Overexpression of AmpC and efflux pumps in Pseudomonas aeruginosa isolates from bloodstream infections: Prevalence and impact on resistance in a Spanish multicenter study, *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55(5):1906-11. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01645-10>
3. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-first informational supplement M100-S21, CLSI, Wayne, Pa (2011).
4. Colom K, Fdz-Aranguiz A, Suinaga E, Cisterna R. Emergence of resistance to beta-lactam agents in Pseudomonas aeruginosa with group I beta-lactamases in Spain, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995;14(11):964-71. PMID: 8654447 <http://dx.doi.org/10.1007/BF01691378>
5. Gutierrez O, Juan C, Cercenado E et al. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in Pseudomonas aeruginosa isolates from Spanish hospitals, *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51(12):4329-35. PMID:17938181 <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00810-07>

6. Gülay Z. Enterobacteriaceae moleküler epidemiyolojisi, *ANKEM Derg* 2014;28(Ek 2):73-6.
7. Kemmerich B, Small GJ, Pennington JE. Comparative evaluation of ciprofloxacin, enoxacin and ofloxacin in experimental *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia, *Antimicrob Agents Chemother* 1986;29(3):395-9.
PMID:2940970
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.29.3.395>
8. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms, *Clin Microbiol Rev* 2009;22(4):582-610.
<http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00040-09>
9. Masuda N, Gotoh N, Ishii C, Sakagawa E, Ohya S, Nishino T. Interplay between chromosomal beta-lactamase and the MexABOprM efflux system in intrinsic resistance to beta-lactams in *Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(2):400-2.
PMID:9925544
10. Öztürk CE, Çalışkan E, Şahin İ. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci ve metallo-beta-laktamaz sıklığı, *ANKEM Derg* 2011; 25(1):42-7.
11. Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations, *Biotechnol Lett* 2004;26(6): 509-15.
PMID:15127793
<http://dx.doi.org/10.1023/B:BILE.0000019559.84305.47>
12. Plasencia V, Borrell N, Macia MD, Moya B, Perez JL, Oliver A. Influence of High Mutation Rates on the Mechanisms and Dynamics of In Vitro and In Vivo Resistance Development to Single or Combined Antipseudomonal Agents, *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51(7):2574-81.
PMID:17470655
13. Sanders CC, Sanders WE. Type I beta-lactamases of gram-negative bacteria: interactions with beta-lactam antibiotics, *J Infect Dis* 1986;154(5):792-800.
PMID:3492960
<http://dx.doi.org/10.1093/infdis/154.5.792>
14. Strateva T, Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance, *J Med Microbiol* 2009;58(9):1133-48.
<http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.009142-0>
15. Tam VH, Chang KT, Schilling AN, LaRocco MT, Gentry LO, Garey KW. Impact of AmpC overexpression on outcomes of patients with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia, *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009;63(3):279-85.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.11.007>