

Betalaktamresistens

hos

Pseudomonas aeruginosa

Rapport av ST-projekt

Sammanställt för Referensgruppen för Antibiotikafrågor (RAF)

Författare:

Susanne Sütterlin

ST-läkare, RAF-praktikant 2013-2014

Klinisk mikrobiologi, Akademiska sjukhuset, Uppsala

Handledare:

Christian G. Giske

Klinisk mikrobiologi, Karolinska Universitetssjukhuset, Solna

BETALAKTAMRESISTENS HOS <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	1
Inledning	4
Kromosomal betalaktamresistens	5
Kromosomal betalaktamas AmpC.....	5
Penicillin-bindande-proteiner (PBP).....	6
Ytmembranproteiner	7
Poriner	7
Effluxpumpar.....	8
Förvärvade betalaktamaser	8
Ambler klass A betalaktamaser.....	8
Ambler klass B betalaktamaser.....	9
Aspekter på spridning av betalaktamaser	10
Referenser	12

Inledning

Pseudomonas aeruginosa är en opportunistisk bakterie med stor anpassnings-förmåga för olika miljöer och under antimikrobiellt press. Bakterien tillhör familjen Pseudomonadaceae och är därmed en klassisk miljöbakterie. *P. aeruginosa* förmår att producera en rad virulensfaktorer och att bilda biofilm. Biofilmsproduktionen bidrar till *P. aeruginosas* miljöresistens som är en orsak till att den är en av de klassiska sjukhusbakterierna.

Som opportunistisk bakterie uppträder den i kliniska sammanhang såväl som kolonizatör som i livshotande tillstånd. De mest drabbade patientgrupperna är intensivvårdskrävande patienter, patienter med kroniska lungsjukdomar såsom CF-patienter, eller patienter som är i behov av långvarig respiratorbehandling.

Som många andra opportunistiska miljöbakterier har *P. aeruginosa* en hel rad inneboende resistensmekanismer som inskränker behandlingsoptionerna. Vanliga medel för behandling av *P. aeruginosa* infektioner är betalaktamer/betalaktamas-inhibitorer, kinoloner (ciprofloxacin) och aminoglykosider (gentamicin, tobramycin, amikacin). Ur gruppen betalaktamer är penicilliner som piperacillin, företrädesvis i kombination med betalaktamasinhibitor tazobaktam, cefalosporiner som ceftazidim eller cefepim och karbapenemer som imipenem, meropenem och doripenem användbara.

Arten *P. aeruginosa* har en stor arsenal av resistensmekanismer mot betalaktamer. De kan indelas i kromosomala mekanismer och horisontellt överförbara mekanismer. De förstnämnda är idag av störst klinisk betydelse, åtminstone i Sverige. Förutsättningar för att en resistent fenotyp kan etableras finns i varje enskilt *P. aeruginosa* isolat och provoceras fram genom ett stort antal av kromosomala mutationer som leder till aktivering av en kromosomal betalaktamas AmpC, inaktivering eller förlust av porin OprD, aktivering av effluxpumpar, framförallt MexAB-OprM och MexXY-OprM, och till modifiering av penicillinbindande proteiner (PBP). De sistnämnda är av mer omdiskuterad betydelse för betalaktamresistens. Förvärv av exogena betalaktamaser som ESBL eller metallobetalaktamaser sker genom horisontell genöverföring och utgör ett av de största hoten inom antibiotikaresistensområdet. Ofta medför förvärv av dessa enzymer en MDR (multidrug-resistance)-fenotyp, vilket gör att dessa isolat blir mycket svårbehandlade.

Syftet med den föreliggande sammanställningen är att ge en överblick över dagens kunskap om *P. aeruginosas* betalaktamresistens.

Kromosomal betalaktamresistens

Kromosomal betalaktamas AmpC

AmpC-enzymerna är en stor familj av betalaktamaser som förekommer i många gramnegativa bakterier som till exempel Enterobacteriaceae, Aeromonadaceae, och Pseudomonadaceae. Alla AmpC-molekyler är i sin tredimensionella struktur starkt konserverade och liknar varandra därmed genom arterna. Substratprofilen för AmpC-enzymerna omfattar stark aktivitet mot penicilliner och cefalosporiner men mindre aktivitet mot monobaktamer. Hydrolysen av cefepim och karbapenemer däremot är låggradig. Idag förekommer den ursprungliga kromosomala AmpC med en delvis vidareutvecklad substratprofil även plasmidburen i många olika arter.

Det kromosomala AmpC är ett betalaktamas som hyperproduceras när bakterien utsätts för antibiotiketryck, vilket sker till exempel under antimikrobiell behandling. Antibiotika som gäller som starka induktorer för hyperproduktion av AmpC är bensylpenicillin, ampicillin, cefalosporiner som cefazolin och cefoxitin, karbapenemer som imipenem, eller betalaktamasinhibitorn klavulansyra; svaga induktorer är cefotaxim, ceftriaxon, ceftazidim, cefepim, cefuroxim, piperacillin och aztreonam (21). I kliniska sammanhang har imipenem visat sig vara en potent induktor för betalaktamresistens orsakad av hyperproducerad AmpC (26).

Reglering av uttrycket av AmpC är komplex, AmpR, AmpD, AmpG och AmpE är regulatorproteiner som var och en kan påverka mängden av AmpC-produktion (26). AmpD anses vara den viktigaste i kliniska sammanhang, mutationer i genen som kodar för AmpD inaktiverar densamma och leder därmed till hyperproduktion av AmpC (21). Hos *P. aeruginosa* är AmpD lokaliserad på tre regioner på kromosomen, och en successiv inaktivering av AmpD leder till stegvis induktion av AmpC. Inaktivering av en av tre AmpD har en låg "fitness-cost" för bakterien, som därmed även bevarar sin virulens trots samtidig betalaktamresistens (27,40,46).

AmpR, en annan AmpC-regulator hos *P.aeruginosa* är dessutom inblandad i reglering av andra faktorer och vice versa. AmpR är ett protein som är aktivt på transkriptionsnivå och reglerar förutom AmpC-produktionen även expressionen av genen *poxB* som kodar för OXA-50, ett kromosomalt reglerat betalaktamas. Men AmpR är också inblandat i regleringen av virulensfaktorer som till exempel pyocyanin och staphylolytic protease LasA and LasB elastase och quorum sensing mekanismer (29).

Sammanfattningsvis kan man säga att hyperproducerad betalaktamas AmpC idag är en av de viktigaste orsakerna till klinisk betalaktamresistens hos *P. aeruginosa*, åtminstone i intensivvårdssammanhang. Utveckling av resistens mot betalaktamer kan ske under behandling, men är sällan kopplad till klonal spridning och involverar nästan alltid hyperproduktion av AmpC (25).

Penicillinbindande proteiner (PBP)

PBP förekommer i alla bakterier och har benämnts efter sin egenskap att kunna binda betalaktamantibiotika. Det är en grupp enzymer som kan återfinnas i cytoplasma eller membranbundet och som är involverade i sista steget av cellväggssyntesen.

För *P. aeruginosa* finns upp till sju PBP beskrivna som har numrerats i fallande ordning motsvarande molekylstorleken. Pseudomonas PBPs brukar indelas i högmolekylära PBP1a, PBP1b, PBP2 och PBP3 som gäller som essentiella för bakteriens överlevnad och icke-essentiella PBP4, PBP5/6 och PBP7 som har låg molekylvikt. PBP1, 2 och 3 har såväl transglykolas- som transpeptidasfunktion, medan de lågmolekylära PBP-enzymerna har DD-karboxypeptidasfunktion. PBP2 och PBP3 spelar en viktig roll ur klinisk synvinkel då de är viktiga målstrukturer för imipenem (PBP2) och cefalosporiner med utvidgat spektrum och cefalosporiner av fjärde generationen (PBP3). PBP2 har sin huvudfunktion i lateral elongation av cellväggen under stationär fas som ger bakterien sin form som stav, medan PBP3 anses ha sin huvudroll inom celldelningsprocessen under tillväxtfasen (32).

PBP-förändringar eller förvärv av nya PBP är välkända mekanismer av betalaktamresistens hos grampositiva bakterier eller *H. influenzae*, medan för gramnegativa arter tillhörande Enterobacteriaceae och *P. aeruginosa* är dessa mekanismer relativt dåligt studerade och den kliniska relevansen är omdiskuterad. Allmänt gäller att mekanismer som leder till betalaktamresistens på grund av PBP-förändringar avser ändrad affinitet för betalaktamantibiotika, reducerad expression av ett PBP eller förändrad enzymatisk aktivitet.

PBP2 och PBP3 är de primära målstrukturer för viktiga antipseudomonala betalaktamantibiotika. Hos några kliniska betalaktamresistenta isolat har man kunnat konstatera minskat uttryck av dessa PBP, men stor interstam-variabilitet avseende PBP2/3 uttrycket gör det svårt att förutsäga denna mekanism. Sekvensering av generna för PBP2 och PBP3 har inte visat några genetiska händelser som kunde förklara strukturförändringar som leder till betalaktamresistens (18,33,38). Däremot var affiniteten av PBP2 respektive PBP3 minskad i flera undersökningar, vilket tyder på posttranskriptionala modifieringar, snarare än genetiska händelser (33,38).

Hämning av PBP3 med ceftazidim i *P. aeruginosa* har till följd att ett flertal förändringar i bakteriecellen leder till ökad motståndskraft mot antibiotika. PBP3-inhibition inducerar transkription av så kallade SOS-gener, som är en reaktion av bakteriell stress. SOS-systemet sätter igång DNA-reparationsprocesser som ökar mutationsfrekvensen. Dessutom uppregleras expression av multi-effluxpumpar, och transkription av porin OprD samt virulensfaktorer nedregleras (5). I ett kliniskt fall har man kunnat visa att aktivering av SOS-systemet lett till aktivering av ett OXA-28 enzym som var inkorporerat i ett integron (20). Intressant i sammanhanget är att imipenem, som i huvudsak har affinitet för PBP2 och som är en stark

induktor av kromosomalt AmpC, inte förmår aktivera SOS-systemet (5,20). PBP3 kodas av *pbpB*, en gen som ligger nära ett genkluster som är involverat i celldelningsprocessen. Utöver PBP3 finns en homolog PBP3x, kodat av en gen som kallas för *pbpC*, som ligger separerad från PBP3. Struktur samt enzymatisk funktion är densamma, men PBP3 uttrycks mest under tillväxtfasen, medan PBP3x uttrycks under den stationära fasen (32).

En annan mekanism för betalaktamresistens är inaktivering av PBP4, som kodas av en *dacB*-ortolog. I en studie kunde betalaktamresistens i flertalet isolat av *P. aeruginosa* med hyperproduktion av AmpC inte förklaras av mutationer i genen för AmpD, däremot i *dacB* genen. Överproduktion av AmpC orsakad av AmpD-mutationer ledde i samma studie inte till kliniskt relevanta MIC-förändringar för betalaktamer, vilket däremot PBP4-inaktivering gjorde. Värt att nämna i sammanhanget är också att imipenem, som är en stark aktivator av AmpC, inhiberar PBP4 kraftfullt (59). Mutation i PBP4 aktiverade dessutom det så kallade CreBC-tvåkomponent systemet, som är en global regulator för metaboliska processer i bakteriecellen och anses ha betydelse för höggradig betalaktamresistens, oberoende av AmpC-produktion (8,39). Inhibition av NagZ, ett enzym inkopplat i slutfasen av cellväggsyntesen (beta-N-acetyl-glukosaminidas), förmår återställa en känslig fenotyp av en AmpC-hyperproducerande, betalaktamresistent *P. aeruginosa*, oberoende av om produktionen var orsakad av *ampD* eller *dacB* mutationer (60).

PBP5 har, som PBP4, låg molekylvikt, och den har DD-karboxypeptidasfunktion. Dessutom fungerar den pseudomonala PBP5 även som "intrinsic" betalaktamas som hydrolyserar penicilliner, cefalosporiner och karbapenemer (34,47). Den utvidgade substratprofilen, jämfört med *E. coli* PBP5 som inte hydrolyserar karbapenemer, uppstår i posttranslationala processer där proteiner får sin tredimensionella struktur (47).

Ytmembranproteiner

P. aeruginosa har generellt en låggradig permeabilitet i sitt yttre membran för molekyler. Däremot har *P. aeruginosa* en höggradig så kallad exklusionsgräns (exclusion limit). Det betyder att, jämfört med *E. coli*, större molekyler kan passera membranen genom huvudsakligen porinet OprF.

Poriner

Poriner definieras allmänt som vattenfyllda proteiner som bilda kanaler i yttre membran av gramnegativa bakterier. Det finns substratspecifika/selektiva och icke-substratspecifika/oselektiva kanaler.

En oselektiv porin (general porin) i *P. aeruginosa* är OprF, som utöver sin kanalfunktion även har en viktig roll i cellväxten. Kliniska isolat av *P. aeruginosa* med multiresistent fenotyp saknar ofta OprF. Hur porinförlusten regleras är okänt, men på genetisk nivå är *oprF*-genen med sin promotor fri från mutationer (19). OprF kan föreligga som öppen eller som stängd kanal i bakteriecellen

samtidigt, och vilken variant som blir inbyggd i cellmembranen påverkar posttranskriptionala vikiningsprocesser (49).

Det finns en rad substratspecifika poriner i *P. aeruginosa*, av störst klinisk vikt är kanske OprD. Imipenem binder till OprD för att penetrera in i cellen, och nedreglering av OprD leder följaktligen till resistens mot imipenem. Även mutationer i OprD leder till mindre specificitet av proteinet för imipenem, vilket också leder till resistens (19).

Hos *P. aeruginosa* finns dessutom ett flertal så kallade "gated porins". En stor grupp är pyoverdiner, som är sideroforer avsedda för järn-upptag. Ett annat exempel i denna grupp är OprC som har tvåvärdigt koppar som substrat (19).

Effluxpumpar

Efflux är en viktig resistensmekanism i *P. aeruginosa*. Med hjälp av effluxpumpar gör sig cellen av med toxiska ämnen och metaboliter.

Kliniskt viktiga effluxproteiner i *P. aeruginosa* tillhör den så kallade RND superfamiljen (resistance-nodulation-division). Dessa effluxpumpar består av tre komponenter, en pump vid cytoplasmamembranet, ett protein lokaliserat i periplasman och en porin i yttre cellmembranet. Bäst studerat hos *P. aeruginosa* är MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN och MexXY i kombination med olika poriner. Typiska antibiotikaklasser som påverkas av aktiv efflux i *P. aeruginosa* är kinoloner (ciprofloxacin), betalaktamer (framför allt meropenem) och aminoglykosider (19,48,49).

I alla studier som är gjorda på knockout-mutantstammar, referensstammar eller på kliniska isolat, visas det ett komplext samspel som involverar ökad AmpC-produktion, porinförluster samt aktivering av multiefflux-pumpar och PBP-förändringar (5,18,38).

Förvärvade betalaktamaser

Ambler klass A betalaktamaser

ESBL-enzymerna (extended-spectrum beta-lactamase) är väl undersökta i Enterobacteriaceae, men det har varit mindre fokus på *P. aeruginosa*.

Ambler klass A betalaktamaser inkluderar ESBL som hämmas av klavulansyra. ESBL-typer ur den gruppen som har rapporterats i *P. aeruginosa* är SHV, TEM, PER, VEB och GES-typ. ESBL-typer som CTX-M-typen har hittills inte beskrivits i arter utanför Enterobacteriaceae (55).

ESBL av SHV- och TEM-typ har sällan isolerats från *P. aeruginosa*, generna har varit lokaliserade på plasmider och har mest hittats i nosokomiala *P. aeruginosa* isolat. Anledningen till att bara ett

fåtal fynd gjordes beror enligt Weldenhagen et al. (55) på tre faktorer: 1) TEM-1 och SHV-1 i sig förekommer sällan, vilket leder till en begränsning i möjlighet att utveckla TEM eller SHV-enzymerna med utvidgat hydrolysspektrum; 2) förekomst av oxacillinaser med utvidgad substratprofil och kromosomalt AmpC kan vara anledning till varför behovet av TEM och SHV är nedsatt; 3) Det kan vara svårt att diagnostisera TEM och SHV av ESBL-typ hos *P. aeruginosa* i kliniska laboratorier, vilket bidrar till att förekomsten möjligen underskattas.

ESBL av VEB- och PER-typ har en liknande substratprofil med hög affinitet för penicilliner och tredje generationens cefalosporiner. PER-1 enzymerna hos *P. aeruginosa* är ofta kopplade till Turkiet, där en undersökning visade frekvent förekomst av PER-1 i *P. aeruginosa* isolat (51). VEB-1 enzymerna är däremot geografiskt mera kopplade till sydöasiatiska regioner (55).

GES-enzymerna har i motsats till de ovan beskrivna enzymerna sannolikt en mera spridd förekomst och är liksom VEB-enzymerna kopplade till klass 1 integroner. GES-2 hydrolyserar cefalosporiner och imipenem, medan meropenem oftast är stabil mot den hydrolytiska aktiviteten av GES-enzymerna. Sedan GES-2 beskrevs för första gången år 2001 i Sydafrika har enzymet spridits och det finns evidens som talar för att det idag förekommer globalt (4,12,30,44).

KPC-enzymerna isolerades först ifrån *K. pneumoniae*, men har successivt hittats i andra arter tillhörande Enterobacteriaceae och *P. aeruginosa* (53). De första rapporterna om KPC-bärande *P. aeruginosa* kom från Syd- och Nordamerika (43,53), men idag kan dessa betraktas som globalt förekommande (1,3,11,13,15,45). KPC-bärande stammar är resistenta mot penicilliner, cefalosporiner med utvidgat spektrum, aztreonam och karbapenemer (56). Gener för KPC-enzymerna, *bla_{KPC}*, är associerade till höggradigt mobila transposoner och till plasmider av inkompatibilitetsgrupper som är frekvent förekommande hos *P. aeruginosa* (41,56).

Detektion av dessa betalaktamaser hos *P. aeruginosa* kan vara svårt i enstaka fall. Det vanliga ESBL-testet baseras på hämning av hydrolytisk aktivitet med hjälp av klavulansyra, men testets utformning som dubbel-disk synergitest kan ge svårtolkade resultat hos *P. aeruginosa*.

Kromosomalt AmpC, porinförluster och effluxmekanismer, ESBL-enzymernas eget substratspektrum samt andra förvärvade betalaktamaser kan ge tolkningsproblem. Genetiska undersökningar med målspecifika primers för *bla*-generna med och utan sekvensering, eller sekvensering av innehåll av integroner har beskrivits som alternativa metoder (55).

KPC-enzymerna kan detekteras med hjälp av fenotypiska tester, som bygger på att enzymets påverkan på karbapenemer kan inhiberas av borsyra men inte av kloxacillin (37).

Ambler klass B betalaktamaser

I denna grupp ingår metallobetalaktamaserna (MBL), som behöver zink i den aktiva "siten" för att kunna hydrolysera betalaktamer. Bakterier som producerar MBL-enzymerna är resistenta mot

samtliga betalaktamantibiotika, förutom aztreonam. Gruppen av MBL omfattar många typer av enzymer, de viktigaste är IMP, VIM, och NDM, och samtliga har beskrivits hos *P. aeruginosa*. Rapporter av dessa MBL är inte kopplade till enstaka geografiska områden, vilket tyder mer på en global förekomst med mest vikt på områden med presumtivt hög nivå av antibiotikaresistens. Ur ett globalt perspektiv så hittas idag enstaka, ofta importerade fynd av MBL-producerande *P. aeruginosa* (16,17,22,28,58) i länder med låggradig prevalens av multiresistenta gramnegativa bakterier. Andra MBL-varianter, som till exempel MBL av SPM-typ, har effektivt spridits i Brasilien, men inte blivit ett globalt fenomen än (2,6). Liksom KPC och GES är även MBL kopplade till mobila genetiska element i form av transposoner och integroner, vilket bidrar till ett effektivt spridningssätt (16,23,24).

Aspekter på spridning av betalaktamaser

Medan AmpC, porinförluster och effluxmekanismer är egenskaper som kan selekteras hos alla *P. aeruginosa*, är förvärvade betalaktamaser ett bekymmer som man försöker motverka genom resistensövervakning och förebyggande åtgärder. Spridning av *bla* gener i *P. aeruginosa* involverar de två klassiska nivåerna: horisontell och vertikal spridning. Horisontell spridning avser överföring av resistensgenen från en bakteriecell till en annan och den viktigaste mekanismen hos *P. aeruginosa* anses idag vara konjugationen (plasmidburen överföring av resistensgener). Med vertikal spridning menas överföring av resistensmarkören från modercell till dotterceller, som sker t ex i en klonal spridning.

Med klonal spridning avses utbredning av isolat som med hjälp av epidemiologiska typningsmetoder bedömts vara nära besläktade. I globalt sammanhang använder man ofta MLST (multi-locus sequence typing) som typningsmetod, och i det för *P. aeruginosa* använda protokollet finns idag 1763 ST-typer definierade (10). En global klon som har uppmärksammats mycket är ST235 *P. aeruginosa*, som har förvärvat en lång rad av Ambler klass A och B enzymer (57) samt virulensmarkörer (35) och som har varit involverad i nosokomiala utbrott (14,52). Kloner, som ST235 *P. aeruginosa*, kan bära på *bla* gener utan särskild fitness-kostnad, och fungerar på det viset som en genreservoar även till andra arter (14).

Plasmider är extrakromosomala genetiska element som oftast klassas efter inkompatibilitetsgrupper; två plasmider av samma inkompatibilitetsgrupp kan inte replikeras i samma bakterie. I enterobakterier har plasmider av grupp IncF, en inkompatibilitetsgrupp som är begränsad till enterobakterier, bidragit till spridning av CTX-M betalaktamaser (7,61). Även om det finns plasmider med konjugationsförmåga till andra bakteriefamiljer verkar förvärv av betalaktamaser i *P. aeruginosa* inte vara kopplad på samma sätt till en särskild grupp av plasmider, snarare till transposoner och integroner.

Klass 1 integroner är genetiska element som brukar innehålla en genkassett med replikerande gener. Integroner kan mobiliseras horisontellt mellan plasmid och kromosom eller mellan arter genom transposoner och ISCR-element, som igen är del av överförbara plasmider (42,50). I och med att transposoner kan mobilisera resistensgener från horisontellt förvärvade plasmider till kromosomen, överförs resistensgenen vertikalt i fortsättningen.

Integroner som har förvärvat betalaktamasgener bär ofta på andra resistensgener samtidigt, framför allt gener kodande för resistens mot trimetoprim, sulfonamider och aminoglykosider, vilket innebär att de förvärvande isolaten blir multiresistenta (54). De flesta typer av karbapenemaser som har hittats i *P. aeruginosa* har varit kopplade till integronstrukturer och transposoner (16,22,24,41,43,55). Hydrolysförmågan av karbapenemaser ökar dessutom när flera karbapenemaser ligger i samma integronkassett (9,36).

Enterobakterier koloniserar ofta tarmen och bildar där en genetisk reservoar för antibiotikaresistens, som på det viset har bidragit till CTX-M-pandemin hos *E. coli* och besläktade arter (7), men samtidigt också öppnat möjlighet för preventionsåtgärder avseende förhindrandet av nosokomial spridning. Gramnegativa miljöbakterier som *P. aeruginosa* däremot isoleras som kliniska fynd ofta från luftvägar, och miljökontamination är vanligt. Dessa fakta försvårar preventivarbetet signifikant, och bidrar till att en resistensreservoar upprätthålls på sjukhusen (31).

Referenser

1. **Akpaka PE, Swanston WH, Ihemere HN, Correa A, Torres JA, Tafur JD, Montealegre MC, Quinn JP, Villegas MV.** 2009. Emergence of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Trinidad and Tobago. *J Clin Microbiol* 47:2670-2671.
2. **Andrade LN, Woodford N, Darini AL.** 2014. International gatherings and potential for global dissemination of Sao Paulo metallo-beta-lactamase (SPM) from Brazil. *Int J Antimicrob Agents* 43:196-197.
3. **Azimi L, Rastegar Lari A, Alaghebandan R, Alinejad F, Mohammadpoor M, Rahbar M.** 2012. KPC-producer gram negative bacteria among burned infants in Motahari Hospital, Tehran: first report from Iran. *Ann Burns Fire Disasters* 25:74-77.
4. **Bebrone C, Bogaerts P, Delbrück H, Bennink S, Kupper MB, Rezende de Castro R, Glupczynski Y, Hoffmann KM.** 2013. GES-18, a new carbapenem-hydrolyzing GES-Type beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* that contains Ile80 and Ser170 residues. *Antimicrob Agents Chemother* 57:396-401.
5. **Blázquez J, Gómez-Gómez JM, Oliver A, Juan C, Kapur V, Martín S.** 2006. PBP3 inhibition elicits adaptive responses in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 62:84-99.
6. **Camargo CH, Bruder-Nascimento A, Mondelli AL, Montelli AC, Sadatsune T.** 2011. Detection of SPM and IMP metallo-beta-lactamases in clinical specimens of *Pseudomonas aeruginosa* from a Brazilian public tertiary hospital. *Braz J Infect Dis* 15:478-481.
7. **Cantón R, Coque TM.** 2006. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol* 9:466-475.
8. **Cavallari JF, Lamers RP, Scheurwater EM, Matos AL, Burrows LL.** 2013. Changes to its peptidoglycan-remodeling enzyme repertoire modulate beta-lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 57:3078-3084.
9. **Correa A, Montealegre MC, Mojica MF, Maya JJ, Rojas LJ, De La Cadena EP, Ruiz SJ, Recalde M, Rosso F, Quinn JP, Villegas MV.** 2012. First report of a *Pseudomonas aeruginosa* isolate coharboring KPC and VIM carbapenemases. *Antimicrob Agents Chemother* 56:5422-5423.
10. **Curran B, Jonas D, Grundmann H, Pitt T, Dowson CG.** 2004. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 42:5644-5649.
11. **Cuzon G, Naas T, Villegas MV, Correa A, Quinn JP, Nordmann P.** 2011. Wide dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing beta-lactamase blaKPC-2 gene in Colombia. *Antimicrob Agents Chemother* 55:5350-5353.
12. **da Fonseca EL, Vieira VV, Cipriano R, Vicente AC.** 2007. Emergence of blaGES-5 in clinical colistin-only-sensitive (COS) *Pseudomonas aeruginosa* strain in Brazil. *J Antimicrob Chemother* 59:576-577.
13. **de Araújo Jácome PR, Alves LR, Cabral AB, Lopes AC, Maciel MA.** 2012. First report of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 56:4990.

14. **Edelstein MV, Skleenova EN, Shevchenko OV, D'Souza J W, Tapalski DV, Azizov IS, Sukhorukova MV, Pavlukov RA, Kozlov RS, Toleman MA, Walsh TR.** 2013. Spread of extensively resistant VIM-2-positive ST235 *Pseudomonas aeruginosa* in Belarus, Kazakhstan, and Russia: a longitudinal epidemiological and clinical study. *Lancet Infect Dis* 13:867-876.
15. **Ge C, Wei Z, Jiang Y, Shen P, Yu Y, Li L.** 2011. Identification of KPC-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in China. *J Antimicrob Chemother* 66:1184-1186.
16. **Giakkoupi P, Petrikkos G, Tzouveleki LS, Tsonas S, Legakis NJ, Vatopoulos AC.** 2003. Spread of integron-associated VIM-type metallo-beta-lactamase genes among imipenem-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* strains in Greek hospitals. *J Clin Microbiol* 41:822-825.
17. **Gilarranz R, Juan C, Castillo-Vera J, Chamizo FJ, Artilles F, Álamo I, Oliver A.** 2013. First detection in Europe of the metallo-beta-lactamase IMP-15 in clinical strains of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect* 19:E424-427.
18. **Giske CG, Buarø L, Sundsfjord A, Wretling B.** 2008. Alterations of porin, pumps, and penicillin-binding proteins in carbapenem resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Drug Resist* 14:23-30.
19. **Hancock RE, Brinkman FS.** 2002. Function of pseudomonas porins in uptake and efflux. *Annu Rev Microbiol* 56:17-38.
20. **Hocquet D, Llanes C, Thouverez M, Kulasekara HD, Bertrand X, Plésiat P, Mazel D, Miller SI.** 2012. Evidence for induction of integron-based antibiotic resistance by the SOS response in a clinical setting. *PLoS Pathog* 8:e1002778.
21. **Jacoby GA.** 2009. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 22:161-182, Table of Contents.
22. **Janvier F, Jeannot K, Tessé S, Robert-Nicoud M, Delacour H, Rapp C, Mérens A.** 2013. Molecular characterization of blaNDM-1 in a sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa* isolate from France. *Antimicrob Agents Chemother* 57:3408-3411.
23. **Jovčić B, Lepšanić Z, Begović J, Filipić B, Kojić M.** 2014. Two copies of blaNDM-1 gene are present in NDM-1 producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Serbia. *Antonie Van Leeuwenhoek* 105:613-618.
24. **Juan C, Beceiro A, Gutiérrez O, Albertí S, Garau M, Pérez JL, Bou G, Oliver A.** 2008. Characterization of the new metallo-beta-lactamase VIM-13 and its integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 52:3589-3596.
25. **Juan C, Gutiérrez O, Oliver A, Ayestarán JI, Borrell N, Pérez JL.** 2005. Contribution of clonal dissemination and selection of mutants during therapy to *Pseudomonas aeruginosa* antimicrobial resistance in an intensive care unit setting. *Clin Microbiol Infect* 11:887-892.
26. **Juan C, Maciá MD, Gutiérrez O, Vidal C, Pérez JL, Oliver A.** 2005. Molecular mechanisms of beta-lactam resistance mediated by AmpC hyperproduction in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother* 49:4733-4738.

27. **Juan C, Moyá B, Pérez JL, Oliver A.** 2006. Stepwise upregulation of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal cephalosporinase conferring high-level beta-lactam resistance involves three AmpD homologues. *Antimicrob Agents Chemother* 50:1780-1787.
28. **Khajuria A, Praharaj AK, Kumar M, Grover N.** 2013. Emergence of NDM - 1 in the Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in India. *J Clin Diagn Res* 7:1328-1331.
29. **Kong KF, Jayawardena SR, Indulkar SD, Del Puerto A, Koh CL, Høiby N, Mathee K.** 2005. *Pseudomonas aeruginosa* AmpR is a global transcriptional factor that regulates expression of AmpC and PoxB beta-lactamases, proteases, quorum sensing, and other virulence factors. *Antimicrob Agents Chemother* 49:4567-4575.
30. **Kotsakis SD, Papagiannitsis CC, Tzelepi E, Legakis NJ, Miriagou V, Tzouvelekis LS.** 2010. GES-13, a beta-lactamase variant possessing Lys-104 and Asn-170 in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 54:1331-1333.
31. **Landman D, Babu E, Shah N, Kelly P, Olawole O, Backer M, Bratu S, Quale J.** 2012. Transmission of carbapenem-resistant pathogens in New York City hospitals: progress and frustration. *J Antimicrob Chemother* 67:1427-1431.
32. **Liao X, Hancock RE.** 1997. Identification of a penicillin-binding protein 3 homolog, PBP3x, in *Pseudomonas aeruginosa*: gene cloning and growth phase-dependent expression. *J Bacteriol* 179:1490-1496.
33. **Liao X, Hancock RE.** 1997. Susceptibility to beta-lactam antibiotics of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing penicillin-binding protein 3. *Antimicrob Agents Chemother* 41:1158-1161.
34. **Livermore DM.** 1987. Radiolabelling of penicillin-binding proteins (PBPs) in intact *Pseudomonas aeruginosa* cells: consequences of beta-lactamase activity by PBP-5. *J Antimicrob Chemother* 19:733-742.
35. **Maatallah M, Cheriaa J, Backhrouf A, Iversen A, Grundmann H, Do T, Lanotte P, Mastouri M, Elghmati MS, Rojo F, Mejdí S, Giske CG.** 2011. Population structure of *Pseudomonas aeruginosa* from five Mediterranean countries: evidence for frequent recombination and epidemic occurrence of CC235. *PLoS One* 6:e25617.
36. **Martínez T, Vázquez GJ, Aquino EE, Ramírez-Ronda R, Robledo IE.** 2012. First report of a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate co-harboring KPC-2 and IMP-18 carbapenemases. *Int J Antimicrob Agents* 39:542-543.
37. **Miriagou V, Cornaglia G, Edelstein M, Galani I, Giske CG, Gniadkowski M, Malamou-Lada E, Martinez-Martinez L, Navarro F, Nordmann P, Peixe L, Pournaras S, Rossolini GM, Tsakris A, Vatopoulos A, Cantón R.** 2010. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clin Microbiol Infect* 16:112-122.
38. **Moyá B, Beceiro A, Cabot G, Juan C, Zamorano L, Albertí S, Oliver A.** 2012. Pan-beta-lactam resistance development in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains: molecular mechanisms, penicillin-binding protein profiles, and binding affinities. *Antimicrob Agents Chemother* 56:4771-4778.

39. **Moyá B, Dötsch A, Juan C, Blázquez J, Zamorano L, Haussler S, Oliver A.** 2009. Beta-lactam resistance response triggered by inactivation of a nonessential penicillin-binding protein. *PLoS Pathog* 5:e1000353.
40. **Moyá B, Juan C, Albertí S, Pérez JL, Oliver A.** 2008. Benefit of having multiple ampD genes for acquiring beta-lactam resistance without losing fitness and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 52:3694-3700.
41. **Naas T, Bonnin RA, Cuzon G, Villegas MV, Nordmann P.** 2013. Complete sequence of two KPC-harboring plasmids from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 68:1757-1762.
42. **Poirel L, Carrër A, Pitout JD, Nordmann P.** 2009. Integron mobilization unit as a source of mobility of antibiotic resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* 53:2492-2498.
43. **Poirel L, Nordmann P, Lagrutta E, Cleary T, Munoz-Price LS.** 2010. Emergence of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 54:3072.
44. **Poirel L, Weldhagen GF, Naas T, De Champs C, Dove MG, Nordmann P.** 2001. GES-2, a class A beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrob Agents Chemother* 45:2598-2603.
45. **Santella G, Cittadini R, Papalia M, Vera Ocampo C, Del Castillo M, Vay C, Gutkind G, Radice M.** 2012. First clonal spread of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Buenos Aires, Argentina. *Infect Genet Evol* 12:2003-2005.
46. **Schmidtke AJ, Hanson ND.** 2008. Role of ampD homologs in overproduction of AmpC in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 52:3922-3927.
47. **Smith JD, Kumarasiri M, Zhang W, Heseck D, Lee M, Toth M, Vakulenko S, Fisher JF, Mobashery S, Chen Y.** 2013. Structural analysis of the role of *Pseudomonas aeruginosa* penicillin-binding protein 5 in beta-lactam resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 57:3137-3146.
48. **Soto SM.** 2013. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence* 4:223-229.
49. **Sugawara E, Nagano K, Nikaido H.** 2012. Alternative folding pathways of the major porin OprF of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS J* 279:910-918.
50. **Toleman MA, Bennett PM, Walsh TR.** 2006. ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? *Microbiol Mol Biol Rev* 70:296-316.
51. **Vahaboglu H, Öztürk R, Aygün G, Coşkuncan F, Yaman A, Kaygusuz A, Leblebicioglu H, Balik I, Aydın K, Otkun M.** 1997. Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother* 41:2265-2269.
52. **Viedma E, Juan C, Acosta J, Zamorano L, Otero JR, Sanz F, Chaves F, Oliver A.** 2009. Nosocomial spread of colistin-only-sensitive sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing the extended-spectrum beta-lactamases GES-1 and GES-5 in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 53:4930-4933.

53. **Villegas MV, Lolans K, Correa A, Kattan JN, Lopez JA, Quinn JP.** 2007. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 51:1553-1555.
54. **Weldhagen GF.** 2004. Integrons and beta-lactamases--a novel perspective on resistance. *Int J Antimicrob Agents* 23:556-562.
55. **Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P.** 2003. Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother* 47:2385-2392.
56. **Wolter DJ, Kurpiel PM, Woodford N, Palepou MF, Goering RV, Hanson ND.** 2009. Phenotypic and enzymatic comparative analysis of the novel KPC variant KPC-5 and its evolutionary variants, KPC-2 and KPC-4. *Antimicrob Agents Chemother* 53:557-562.
57. **Woodford N, Turton JF, Livermore DM.** 2011. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 35:736-755.
58. **Yan JJ, Hsueh PR, Ko WC, Luh KT, Tsai SH, Wu HM, Wu JJ.** 2001. Metallo-beta-lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 45:2224-2228.
59. **Zamorano L, Moyá B, Juan C, Oliver A.** 2010. Differential beta-lactam resistance response driven by ampD or dacB (PBP4) inactivation in genetically diverse *Pseudomonas aeruginosa* strains. *J Antimicrob Chemother* 65:1540-1542.
60. **Zamorano L, Reeve TM, Deng L, Juan C, Moyá B, Cabot G, Vocado DJ, Mark BL, Oliver A.** 2010. NagZ inactivation prevents and reverts beta-lactam resistance, driven by AmpD and PBP 4 mutations, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 54:3557-3563.
61. **Zhao WH, Hu ZQ.** 2013. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in Gram-negative bacteria. *Crit Rev Microbiol* 39:79-101.